

UNTERSUCHUNGEN ZUR
PRIMÄRSTRUKTUR DER
LACTATDEHYDROGENASE -
ISOENZYME DES
SCHWEINES

Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biochemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
HELMUT MEYER
aus Salzwedel

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

U N T E R S U C H U N G E N Z U R
P R I M Ä R S T R U K T U R D E R
L A C T A T D E H Y D R O G E N A S E -
I S O E N Z Y M E D E S
S C H W E I N E S



Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biochemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

HELMUT MEYER

aus Salzwedel

1976



Danksagung

Für das Zustandekommen vorliegender Arbeit bin ich zu besonderem Dank verpflichtet

Herrn Prof. Dr. G. Pfeleiderer für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes sowie für die großzügige finanzielle Unterstützung,

Herrn Dr. H.H. Kiltz für die fachkundige Anleitung und intensive Betreuung,

Herrn Dr. K. Beyreuther für die umfassende Einführung in die automatische Sequenzanalyse und die Erlaubnis, seine Geräte zu benutzen,

Herrn Prof. M. G. Rossmann für den intensiven Meinungsaustausch über seine Ergebnisse der Röntgenstrukturanalyse der LDH,

Frau G. Troost für die Mithilfe bei den zahlreichen Säulenläufen und Diskelektrophoresen,

Herrn E. Poth für die Durchführung des manuellen Edman-Abbaus und die Mithilfe bei den Peptidkupplungen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Inhaltsübersicht

I.	Einleitung	1
II.	Material und Methoden	4
III.	Peptidisolierung	22
IV.	Sequenzanalyse	47
V.	Diskussion	68
VI.	Zusammenfassung	87
VII.	Literaturnachweis	89

Abkürzungen

APG	Aminopropylglas
CP-A	Carboxypeptidase A
CP-B	Carboxypeptidase B
DC	Dünnschichtchromatographie
DFP	Diisopropylfluorphosphat
DMF	Dimethylformamid
GC	Gaschromatographie
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (ox./red.)
PITC	Phenylisothiocyanat
PTH	Phenylthiohydantoin
SDS	Natriumdodecylsulfat
TFA	Trifluoressigsäure
TPCK	N-Tosyl-L-phenylalanyl-chlormethan

I. Einleitung

Die L-Lactatdehydrogenase (EC. 1.1.1.27, LDH) ist das letzte Enzym in der Glykolysekette und katalysiert die Reaktion:



Schon in den fünfziger Jahren wurde festgestellt, daß sich gereinigte LDH-Präparationen elektrophoretisch in mehrere enzymatisch aktive Banden auftrennen lassen (1-4).

Appella und Markert (5) konnten 1961 nachweisen, daß es sich bei der LDH um ein tetrameres Molekül handelt. Das Auftreten fünf elektrophoretisch unterschiedlicher Banden konnte durch das Auftreten zweier verschiedener Untereinheiten H (Herz) und M (Skelettmuskel) erklärt werden.

Diese bilden Tetramere folgender Zusammensetzung:

HHHH	H ₄
HHHM	H ₃ M
HHMM	H ₂ M ₂
HMMM	H M ₃
MMMM	M ₄

Bestätigung fand dieses Ergebnis in immunologischen Versuchen (6,7). Antiserum gegen reine Herzmuskel-LDH zeigte keine Kreuzreaktion gegen die Skelettmuskel-LDH derselben Spezies und umgekehrt. Dagegen war es möglich, mit Antiserum gegen Skelettmuskel-LDH der einen Spezies Kreuzreaktionen gegen die Skelettmuskel-LDH anderer Spezies nachzuweisen.

Für jedes Organ eines Tieres ließ sich ein typisches Verteilungsmuster der LDH-Isoenzyme finden.

Dabei dominiert in sauerstoffarmen Geweben die Skelettmuskelform, in sauerstoffreichen die Herzmuskelform (8-10).

In der darauffolgenden Zeit konnte eine Reihe weiterer Unterschiede zwischen den beiden Homotetrameren erforscht werden:

1. LDH- H_4 und - M_4 haben eine unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung (11).
2. Die Umsatzgeschwindigkeit von α -Ketocarbonsäuren fällt mit steigender Kettenlänge der aliphatischen Seitenkette bei der LDH- M_4 sehr viel schneller ab als bei der LDH- H_4 (12-14).
3. Die Umsatzgeschwindigkeit ist bei der LDH- M_4 fast doppelt so groß wie bei der LDH- H_4 (15-17).
4. Das Herzmuskelenzym ist bei den meisten untersuchten Spezies ein sehr viel schlechteres Immunogen als die LDH- M_4 (6,7,15,16,18-20).
5. Die LDH- H_4 reagiert sehr viel empfindlicher auf Veränderungen der Carboxamidgruppe des Nicotinamidringes (21,22).
6. Die LDH- H_4 wird durch Pyruvat in hoher Konzentration gehemmt (17,21,23,24).
7. Die LDH- H_4 bindet NAD^+ und NADH fester als die LDH- M_4 (25-27).

Eine Möglichkeit, für diese Unterschiede eine Erklärung auf molekularer Ebene zu finden, besteht in der Aufklärung der Primär- und Tertiärstruktur von Isoenzympaaren der LDH. Es wäre wünschenswert, wenn diese Daten einer möglichst großen Anzahl von LDH-Isoenzymen verschiedener Spezies miteinander verglichen werden könnten. Auf diese Weise sollte es möglich sein zu entscheiden, welche charakteristischen Unterschiede in der Aminosäuresequenz die oben angeführten Eigenschaften der beiden Isoenzyme bewirken.

Die Aufklärung der Primär- und Tertiärstruktur der Dogfisch LDH- M_4 durch S.S. Taylor und M. Rossmann (28) hat schon wichtige Einblicke in den Katalysemechanismus der LDH erbringen können, aber erst der Ver-

gleich mit den Daten anderer Arbeitsgruppen wird die Frage nach den spezifischen Unterschieden zwischen der LDH-H₄ und -M₄ beantworten können.

Unsere Arbeitsgruppe hat sich das Ziel gesetzt, beide Isoenzyme der Schweine-LDH in der Primärstruktur aufzuklären.

Die Aufgabe meiner Arbeit war die Isolierung der tryptischen Fragmente der LDH-H₄ nach Citraconylierung. Da H.H.Kiltz⁽²⁹⁾ bereits zu Beginn dieser Arbeit mit Hilfe der BrCN-Peptide schon große Bereiche beider Isoenzyme sequenziert hatte, sollte versucht werden, vor allem die methioninhaltigen Peptide aus der tryptischen Verdauung in ihrer Primärstruktur aufzuklären, um mittels dieser Überlappungen die Zuordnung der BrCN-Fragmente zu ermöglichen. Zudem sollten solche Bereiche aus der LDH-H₄ sequenziert werden, zu denen mit Hilfe der BrCN-Fragmente noch kein Zugang gelungen war. Parallel dazu führte ich die Sequenzanalyse einiger Peptide der LDH-M₄ durch, die während der Dissertation von W.Keil⁽³⁰⁾ zwar isoliert, aber noch nicht sequenziert worden waren.

Die Lösung dieser Aufgaben sollte es ermöglichen, die Primärstruktur beider Schweine-LDH-Isoenzyme aufzuklären und durch Vergleich der beiden Sequenzen charakteristische Unterschiede zu finden.

II. Material und Methoden

1. Reinheitsprüfung der LDH-H₄ und Dialyse

Schweine LDH-H₄ wurde als Kristallsuspension in 3,2M Ammoniumsulfat von der Firma Boehringer-Mannheim bezogen (Konzentration: 10mg/ml).

Reinheitsprüfung

a) spez. Aktivität	455 IU/mg
b) SH-Gruppen	4,6/UE
c) NAD-Sulfit Bindungsvermögen	1,2/UE
d) In der Niederspannungselektrophorese auf Acetatfolie bei pH 8,6 bleibt kein denaturiertes Protein am Start. Bande II (H ₂ M) weniger als	10%

Dialyse

1g LDH-H₄ wurde zum Entsalzen dreimal gegen 10l 50mM Phosphatpuffer pH 7,2 (0,02% Mercaptoäthanol) und sodann noch dreimal gegen 10l Wasser (0,02% Mercaptoäthanol) dialysiert. Das Dialysat wurde anschließend gefriergetrocknet.

2. Aminoäthylierung der LDH-H₄ ⁽³¹⁾

1g entsalzte Schweine-LDH-H₄ wurde in 100 ml 8M Harnstoff (1M an 2-Amino-2-methyl-1,3-propanediol, 0,01M an Mercaptoäthanol) gelöst und sodann sechsmal im Abstand von 15 Minuten mit 0,5 ml Äthylenimin (Fluka, Buchs) versetzt. Nach der letzten Zugabe wurde 30 Minuten ausgerührt. Überschüssiges Äthylenimin wurde durch Zugabe von 1 ml Mercaptoäthanol zerstört. Der

Reaktionsansatz wurde anschließend dreimal gegen jeweils 10l Wasser (0,05% Mercaptoäthanol) dialysiert und gefriergetrocknet. Um die modifizierte LDH-H₄, die bei der Dialyse präzipitiert, von Salz- und Harnstoffresten zu befreien, wurde das Lyophilisat einer Gelchromatographie an Sephadex G-25-f (5X120 cm) in 30%-iger Essigsäure unterworfen. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und gefriergetrocknet.

Nitroconylierung⁽³²⁾ und tryptische Verdauung

500 mg aminoäthylierte (AA-) LDH-H₄ (17,2 µM) wurden in 25 ml 8 M Harnstoff gelöst (vorher durch Ausrühren über Nacht mit NH₃ bei pH 10 von Isocyanat befreit, dann mit Essigsäure neutralisiert). Die Lösung wurde am Autotitrator (Radiochem. Centre, Amersham) auf pH 8,5 eingestellt. Sodann wurden bei Raumtemperatur unter Stickstoff 0,5 ml Nitroconylsuccinimid (Pierce) in Chloroform zu je 0,1 ml in Abständen von 5 -10 Minuten hinzugefügt. Der pH-Wert wurde durch Zutitrieren von 5 N Natronlauge bei pH 8,5 konstant gehalten. Nach der letzten Zugabe wurde noch eine Stunde ausgerührt.

Zur Abtrennung des Harnstoffs und des Salzes wurde eine Gelchromatographie an Sephadex G-50 f (4x180 cm) in 0,1 M Triäthylammoniumacetatpuffer, pH 8,5, angeschlossen. Das in einem Gipfel eluierende Proteinmaterial wurde gesammelt und gefriergetrocknet.

Bei meinem ersten Versuch habe ich das Lyophilisat noch zweimal in Wasser gelöst und jeweils wieder gefriergetrocknet, um Salzreste zu entfernen. Danach wurde die citraconylierte AA-LDH-H₄ in 100 ml 0,2 M N-Äthylmorpholinacetatpuffer pH 8,5 (0,1% Thiodiglykol, 3mM Ca⁺⁺ und 0,02% NaN₃) gelöst und sodann 40 Minuten bei 37°C mit 0,3 mg

affinitätschromatographisch gereinigtem Rindertrypsin⁽³³⁾ (in 1 ml n/1000 HCl) verdaut. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 1,05 mg Kallikrein-Trypsininhibitor beendet und jeweils ein Drittel dieses Verdauungsansatzes auf einer Sephadex G-50 f-Säule (3x160 cm) in 0,05 M Triäthylammoniumacetatpuffer pH 8,5 vorgetrennt.

Beim zweiten Versuch wurde die citraconylierte AÄ-LDH-H₄ nach der ersten Gefriertrocknung in 30 ml 0,1 M N-Äthylmorpholinacetatpuffer pH 8,5 (3 mM Ca⁺⁺, 0,1% Thiodiglykol und 0,02% Na₂E₂) gelöst und abermals am Autotitrator wie zuvor mit einem 40-fachen Überschuß Citraconsäureanhydrid modifiziert. In dieser Lösung wurde nach weiteren 20 Minuten Ausrühren direkt die tryptische Verdauung durchgeführt. Dazu wurde der Reaktionsansatz auf 37°C erwärmt und sodann mit 20 mg gereinigtem Rindertrypsin (in 1 ml n/1000 HCl) versetzt. Nach 90 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von Essigsäure(bis auf pH 3) beendet. Zur Decitraconylierung wurde noch eine Stunde bei Zimmertemperatur gerührt und der Gesamtansatz gefriergetrocknet.

Zur Vortrennung wurde jeweils ein Viertel dieses Ansatzes in wenig Ameisensäure gelöst und über eine Sephadex G-50 f-Säule (3x160 cm) in 30%-iger Essigsäure chromatographiert.

• Affinitätschromatographie nach Hilschmann⁽³⁴⁾

Dowex 1x2-Marz (200-400 mesh, Serva, Heidelberg) wurde zunächst in die Acetatform überführt und sodann in eine auf 37°C thermostatisierte Säule (1,2x120 cm) eingefüllt. Mit entgastem Wasser wurde neutralgewaschen und anschließend mit Startpuffer pH 8,5 solange äquilibriert, bis der Auslauf denselben pH aufwies. Der mit verdünnter Natron-

lauge auf pH 9,5 eingestellte Verdauungsansatz wurde sodann unter Stickstoffdruck eingepreßt. Eluiert wurde unter Pumpendruck (Mini Pump, Milton-Roy Co., St. Petersburg, Florida, USA) mit einer Flußgeschwindigkeit von 30 ml/h, wobei pro Fraktion 6 ml gesammelt wurden. Zur Erzeugung eines sigmoidalen pH- und Acetatgradienten wurden in einem Mischgefäß 500 ml Startpuffer pH 8,5 vorgelegt und nacheinander die in der Tabelle aufgeführten Komponenten eingeleitet.

Nr.	Komponente	Fraktion
1	1% Pyridin, 1% Picolin, 1% 2,4-Lutidin, 0,1% Thiodiglykol, mit Essigsäure auf pH 8,5 justiert	1-30
2	wie 1, mit Essigsäure auf pH 7,5 justiert	31-20
3	0,1 M Essigsäure, 0,1% Thiodiglykol	81-180
4	0,2 M " "	181-300
5	0,5 M " "	301-420
6	3,0 M " "	421-470
7	Eisessig, bis der pH unter 1 sinkt	ab 471

5. Kationenaustauscherchromatographie über Technicon P ⁽³⁴⁾

Vor jedem Lauf wurde das Austauscherharz (200-400 mesh, Technicon Instr., Chertsey, UK) in der Säule (0,6x50 cm, auf 37°C temperiert) mit 160 ml 2 M Pyridin-acetat-Puffer pH 5,2 regeneriert und mit Wasser neutralgewaschen. Zunächst wurden 10 ml Ameisensäure unter Stickstoffdruck eingepreßt und sodann die Probe (in 50%-iger Ameisensäure gelöst) aufgegeben. Nach dem Einpressen wurde noch 3-4 mal mit 50%-iger Ameisensäure nachgewaschen und dann

mit Startpuffer aufgefüllt und unter Pumpendruck (Milton-Roy, Mini Pump) nach dem unten angegebenen Schema eluiert. Bei einem Fluß von 20 ml/h wurden Fraktionen zu je 3 ml gesammelt.

Nr.	Elutionsmittel	Fraktion
1	0,1 oder 0,2 M Pyridiniumacetatpuffer pH 3,1, 30%-ig an Propanol	1- 27
2	Linearer Gradient aus 190 ml Elutionsmittel 1 und 190 ml 2 M Pyridiniumacetatpuffer pH 5,2, 30%-ig an Propanol	28-148
3	0,5 M Natronlauge	ab 149

Anionenaustauscherchromatographie an Dowex 1x2 mit propanolhaltigen Puffern⁽³⁴⁾

Zur Rechromatographie der gesammelten Fraktionen des vorhergehenden Anionenaustauscherlaufes wurden die unter pH 4 eluierten Peptide über eine Dowex 1x2 Säule (200-400 mesh, Serva, 0,5x50 cm) nachgereinigt. Hierbei wurden alle Elutionsmittel mit 30% n-Propanol versetzt.

Zur Erzielung eines Gradienten wurden 200 ml Startpuffer in ein Mischgefäß gefüllt und nacheinander die verschiedenen Elutionsmittel dazugetropft.

Nr.	Elutionsmittel	Fraktion
1	1% Pyridin, 1% Picolin, 1% 2,4-Lutidin, 0,1% Thiodiglykol mit Essigsäure auf pH 8,5 eingestellt, 30%-ig an n-Propanol	Vorlage
2	wie 1, mit Essigsäure auf pH 7,5 eingestellt	1-15

Nr.	Elutionsmittel	Fraktion
2	0,1 M Essigsäure, 30% n-Propanol	16-30
3	0,2 M " "	31-40
4	0,5 M " "	41-60
5	2,0 M " "	61-100
7	Eisessig, bis der pH des Eluats unter 1 sinkt	ab 101

1. Gelchromatographie an Sephadex G 50-f in 70%-iger Ameisensäure

Sephadex G 50-f (Pharmacia, Schweden) wurde über Nacht in 70%-iger Ameisensäure gequollen und sodann in eine Säule (3x160 cm) gefüllt. Zunächst wurde mit 2l 70%-iger Ameisensäure gewaschen und dann die in reiner Ameisensäure gelöste Probe aufgegeben. Eluiert wurde ebenfalls mit 70%-iger Ameisensäure, und es wurden 10 ml pro Fraktion gesammelt. Nach dem Ergebnis der Absorption bei 280 nm wurden die Fraktionen möglichst schnell gesammelt und nach dem Verdünnen mit Wasser gefriergetrocknet.

2. Chromatographie an Biorex-70

Biorex-70 (200-400 mesh, Bio-Rad Laboratories, Richmond, Cal., USA) ist ein Kationenaustauscher aus Polyacrylsäure. In der H⁺-Form wurde das Austauscherharz in eine Säule (2x10 cm) gefüllt und über Nacht mit entgaster 5%-iger Ameisensäure äquilibriert. Die Probe wurde zunächst in reiner Ameisensäure gelöst und dann mit Wasser auf 5% verdünnt und aufgegeben. Zur Elution der Peptide wurde ein Stufengradient mit steigenden Ameisensäurekonzentrationen verwendet. Pro Fraktion

wurden 5 ml gesammelt.

Nr.	Elutionsmittel	Fraktion
1	5%-ige Ameisensäure	1- 40
2	20%-ige "	41- 64
3	40%-ige "	65-150
4	60%-ige "	151-190
5	100%-ige "	ab 191

9. Detektion der Säuleneluate

a) Messung der UV-Absorption

Bei allen Säulenläufen ohne pyridinhaltige Puffer wurde routinemäßig mit einem Uvicord II (LKB-Produkt, Stockholm, Schweden) im Durchfluß die Transmission des Eluates bei 280 nm gemessen.

b) Tüpfeltest mit Fluorescamin (Floram)⁽³⁵⁾

5-20 µl pro Fraktion wurden auf eine DC-Fertigplatte aufgetragen, bei 100°C 15 Minuten getrocknet und nach dem Erkalten mit einer Lösung aus 0,6 mg Floram (Serva, Heidelberg) in 10 ml Aceton (Uvasol, Merck) besprüht. Proteinhaltige Fraktionen konnten durch weiße Fluoreszenz im UV-Licht (350 nm) identifiziert werden.

c) Peptidbestimmung nach Moore und Stein⁽³⁶⁾

Bei allen Säulenläufen mit pyridinhaltigen Puffern wurden 50-500 µl Probenlösung pro Fraktion entnommen, mit 0,3-0,5 ml 4 M NaOH versetzt und 90 Minuten im siedenden Wasserbad hydrolysiert. Nach der Neutralisation mit 4 M HCl wurde die Lösung mit 1 ml 4 M Natriumacetatpuffer pH 5,51 (enthält

0,75% Ameisensäure als Reduktionsmittel) und 1 ml 3%-iger Ninhydrinlösung in Methylcellosolve versetzt, zur Durchmischung aller Komponenten gut geschüttelt und abermals auf dem siedenden Wasserbad 15 Minuten erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde im Eppendorffphotometer in 1 cm Küvetten die Extinktion bei 578 nm gemessen.

10. Dünnschichtchromatographie

Zur Reinheitskontrolle wurden 10-20 nM Peptid nach den Säulenchromatographien dünnschichtchromatographisch untersucht. Es wurden DC-Fertigplatten der Firma Macherey Nagel benutzt. Zur Auftrennung der einzelnen Komponenten wurde in einem Tank mit n-Butanol - Pyridin - Eisessig - Wasser (34-20-7-12,5) aufsteigend chromatographiert. Die Identifizierung der Peptide wurde mit folgenden Reagenzien durchgeführt:

a) Ninhydrinreagenz nach Clotten (37)

1g Ninhydrin, 60 ml Methanol, 350 ml n-Butanol und 30 ml 2 N Essigsäure.

Die getrocknete Dünnschichtplatte wurde mit dem Reagenz eingesprüht und dann für 10-15 Minuten im Trockenschrank auf 100°C erhitzt. Die dabei sichtbar gewordenen Flecken wurden abgezeichnet.

b) Pauly's Reagenz (38)

Ein Spatel voll diazotierter Sulfanilsäure wurde in 10%-iger Natriumcarbonatlösung gelöst und damit die getrocknete Dünnschichtplatte besprüht. Noch während des Sprühens färbten sich histidinhaltige Flecken rot und tyrosinhaltige violett. Da dieses Färbereagenz auch noch nach der Behandlung mit Ninhydrin eine Färbung hervorruft, wurde es meist im Anschluß an diese Färbemethode angewandt.

c) Cl/J Reagenz nach Rydon und Smith (39)

Zur Detektion ninhydrin- und paulynegativer Peptide wurde diese Methode angewandt, da sie auf Peptidbindungen anspricht.

Zur Erzeugung der Chloratmosphäre wurden in einem Chromatographietank je 5 ml 0,1 M KMnO_4 -Lösung und 10%-ige HCl zusammengegeben.

Die Färbelösung besteht aus einem Teil N/20 KJ-Lösung und 4 Teilen Benzidin in 20%-iger Essigsäure, die unmittelbar vor der Anfärbung zusammengeschüttet werden.

Nach der Ninhydrinfärbung wurden die Dünnschichtplatten mit Wasserdampf leicht angefeuchtet und für 10-15 Minuten der Chloratmosphäre ausgesetzt. Nach der Chlorierung wurde die Platte im Luftstrom solange abgeblasen, bis kein Chlorgeruch mehr feststellbar war. Sofort danach wurde mit der Färbelösung besprüht. Unmittelbar darauf entwickelten sich je nach der Peptidmenge schwach- bis tiefblaue Flecken.

11. Disk-Elektrophorese

Größere Peptide wurden zur Reinheitskontrolle diskelektrophoretisch nach den Systemen von H. Tamura⁽⁴⁰⁾ und H.R.Maurer⁽⁴¹⁾ untersucht.

Alle drei von mir benutzten Systeme enthalten wegen der besseren Löslichkeit der Proteinfragmente Harnstoff. Die Lösungen für die Disk-Elektrophorese werden in unserem Labor routinemäßig benutzt und sind in ihrer genauen Zusammensetzung in der Dissertation von W.Keil⁽³⁰⁾ beschrieben.

Disk-Elektrophoresen wurden bei pH 9,5 mit und ohne SDS, bei pH 4,3 nur ohne SDS durchgeführt. 10-150 μg Protein wurden im jeweiligen Probenpuffer gelöst und auf die Gele aufgetragen. Bei der SDS-Disk-Elektrophorese hat es sich sehr bewährt,

die Inkubation bei Zimmertemperatur über Nacht oder sogar mehrere Tage lang durchzuführen, da die sonst in der Literatur angegebenen Zeiten (z.B. 1 h bei 80°C) bei den tryptischen Fragmenten der LDH-H₄ nicht ausreichend waren. Ich konnte feststellen, daß bei den längeren Inkubationszeiten eine sehr viel bessere Entfaltung und damit auch weniger Banden zu beobachten waren.

Die Gele der Disk-Elektrophorese bei pH 9,5 wurden direkt während des Laufes angefärbt, indem man den oberen Elektrodenpuffer (250 ml) mit 2,5 ml einer 0,5%-igen Amidoschwarzlösung versetzte. Entfärbt wurde in 7,5%-iger Essigsäurelösung. Die Gele der pH 9,5er SDS- und der pH 4,3er Disk-Elektrophorese wurden nach Ende des Laufes zunächst zur Entfernung der Harnstoffs 1 Stunde in 7,5%-iger Essigsäure gerührt. Sodann wurden sie 1 Stunde mit einer 0,25%-igen Coomassie-Brillant-Blue-Lösung in Methanol/Eisessig/Wasser (5-1-5) angefärbt. Zum Entfärben wurden sie in 7,5%-ige Essigsäure gestellt, die mit 30% Methanol versetzt war.

12. Aminosäureanalysen

Aminosäureanalysen wurden auf einem Bio-Cal BC 200 Aminosäureanalysator mit automatischem Probenaufgeber und Integrator durchgeführt.

5-10 nM Peptid wurden in ein Duranreagenzglas überführt, mit 0,3 ml 6 N HCl versetzt und unter Vakuum abgeschmolzen. Die routinemäßige Hydrolysedauer betrug 20 Stunden bei 108°C. Bei wichtigen Analysen wurde auch 48 und 96 Stunden hydrolysiert. Zur Tryptophanbestimmung wurde 96 Stunden mit 0,5 ml 3 M Mercaptoäthansulfonsäure (Pierce) hydrolysiert.

Die HCl-Hydrolysen wurden dann im Vakuum über NaOH zur Trockene eingedampft, in Probenpuffer pH 2,2 gelöst und auf den Aminosäureanalysator aufgegeben.

Die Mercaptoäthansulfonsäurehydrolysen wurden mit 4 N NaOH zu 2/3 neutralisiert, wenn nötig mit Wasser verdünnt und direkt analysiert.

12. Aminosäureanalyse von Diskbanden (42)

In obiger Literaturstelle wird nur die Analyse mit Amidoschwarz angefärbter Banden angegeben. Abweichend und in Ergänzung hierzu wurde dazu übergegangen, auch die Banden der SDS-Diskelektrophorese, die routinemäßig mit Coomassie-Brillant-Blue angefärbt wurden, aufzuarbeiten. Da diese Anfärbemethode erheblich empfindlicher ist als mit Amidoschwarz, mußten hierzu für eine Aminosäureanalyse mehrere Banden identischer Proben zusammen aufgearbeitet werden.

Die nach der üblichen Aufarbeitung der Diskelektrophorese sichtbar gewordenen Banden wurden unter Vermeidung der direkten Berührung mit den bloßen Fingern mit einer scharfen Rasierklinge ausgeschnitten und in ein Hydrolysereagenzglas überführt. Bei der SDS-Diskelektrophorese wurden mehrere (bis zu 6) identische Banden zusammen in ein Hydrolysereagenzglas überführt.

Diese Gelscheibchen wurden sodann eingefroren und gefriergetrocknet. Die getrockneten Scheibchen wurden mit 3 ml 6 N HCl und 20 μ l Mercaptoäthanol versetzt, abgekühlt und im Hochvakuum abgeschmolzen. Anschließend wurden die Proben 20 Stunden bei 108°C hydrolysiert.

Im Anschluß an die Hydrolyse wurden die Proben im Kühlschrank auf 4°C abgekühlt, der Inhalt der Hydrolysereagenzgläser in ein Zentrifugenglas überführt und die ausgefallene Polyacrylsäure abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgehebert, der Niederschlag noch zweimal mit 1 ml 1 N HCl aufgewirbelt und wiederum abzentrifugiert und die anfallenden Überstände mit

dem ersten Überstand vereinigt. Die gesammelten Lösungen wurden auf -20°C abgekühlt und alsdann im Exsiccator über NaOH im Hochvakuum zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wurde mit Aufgabepuffer pH 2,2 für den Analysator aufgenommen und anschließend analysiert.

Die erforderlichen Peptidmengen liegen zwischen 10 und 20 nM. Die Ausbeute in der Analyse liegt dann zwischen 10 und 30%.

14. Carboxypeptidase-A und -B-Verdauung (43)

CP-A (61,3 mg/ml) wurde als Kristallsuspension und CP-B (7,5 mg/ml) als Lösung von der Firma Worthington (New Jersey, USA) bezogen. Beide Proteasen sind mit Diisopropylfluorophosphat behandelt. Die Carboxypeptidase-A und -B-Verdauung wurde an einem Peptid zur Aufklärung der C-terminalen Aminosäuresequenz durchgeführt.

200 nM Peptid wurden in 200 μl 0,5 M N-Äthylmorpholinacetatpuffer pH 8,5 gelöst und mit je 1 μl Carboxypeptidase-A und -B bei 37°C verdaut. Für eine Zeitstudie wurden jeweils nach 10, 20, 30, 40, 60, 90 und 120 Minuten 25 μl entnommen, mit Probenpuffer pH 2,2 verdünnt und auf dem Aminosäureanalysator untersucht.

15. Manueller Edman-Abbau (44)

Nach dieser Methode wurden kleinere Argininpeptide und Lysinpeptide nach Modifizierung mit 4-Sulfo-Phenylisothiocyanat (Pierce) sequenziert.

Größere Peptide wurden ansequenziert, um ihre Sequenzierbarkeit für die automatische Sequenzanalyse zu überprüfen.

0,2 - 1 μMol Peptid wurden in 0,5 ml Dimethylallylamin-Puffer (0,4 M DMAA-TFA-Puffer in Pyridin-Wasser 3/2 v/v, Pierce, sequenal grade), pH 9,5, gelöst, mit 50 μl Phenylisothiocyanat (PITC, Merck,

Darmstadt) oder 50 μ l einer 5%-igen 4-Sulfo-PITC-Lösung (Pierce) versetzt, mit Stickstoff begast und unter gelegentlichem Aufwirbeln 30 Minuten bei 57°C gehalten. Danach wurde die Lösung tiefgeköhlt und im Vakuum gefriergetrocknet. Zum Entfernen des überschüssigen PITC wurde dreimal mit 0,5 ml Benzol (zweimal umkristallisiert, unter N_2 destilliert) extrahiert und der Rückstand im Vakuum getrocknet. Nach dem Trocknen wurde mit 0,5 ml Trifluoressigsäure versetzt, mit Stickstoff begast und 5 Minuten bei 57°C im Wasserbad erhitzt. Die TFA wurde im Stickstoffstrom abgeblasen und der getrocknete Rückstand dreimal mit Chlorbutan extrahiert. Der Rückstand wurde im Vakuum getrocknet und in die nächste Kupplung eingesetzt.

Die vereinigten Chlorbutanextrakte wurden im Stickstoffstrom getrocknet, mit 0,2 ml 1 N HCl versetzt und 10 Minuten auf 80°C erhitzt. Nach dem Abköhlen wurde dreimal mit 0,5 ml Essigsäureäthylester extrahiert, die vereinigten Essigesterphasen mit Stickstoff trockengeblasen und der Rückstand in 50 μ l Aceton gelöst.

Ein Aliquot dieser Lösung wurde für die Rückhydrolyse ⁽⁴⁵⁾ in ein Duranreagenzglas (50x100mm) überführt, nach dem Eintrocknen im Stickstoffstrom mit 0,3 ml 6 N HCl (0,1% $SnCl_2$) versetzt und sodann in einem Glasautoklaven unter Stickstoff 5 Stunden bei 150°C hydrolysiert. Nach dem Erkalten wurde die Probe im Vakuum über NaOH getrocknet, in Probenpuffer pH 2,2 gelöst und im Aminosäureanalysator bestimmt.

Auf diese Weise ließen sich Glx, Asx, Pro, Gly, Val, Met, Leu, Ile, Tyr, Phe und Lys eindeutig identifizieren. PTH-Threonin wird unter obigen Bedingungen als α -Aminobuttersäure bestimmt. Serin, Alanin und Aminoäthylcystein ergaben unter Rückspaltungsbedingungen Alanin und mußten daher eben-

so wie Asp, Asn und Glu, Gln dünnschichtchromatographisch erfaßt werden. Tryptophan wurde zerstört und ergab einen erhöhten Glycin- und Alanin-Wert. Histidin und Arginin wurden bei der Essigesterextraktion nicht mitextrahiert und mußten durch Rückhydrolyse der wässrigen Phase identifiziert werden.

Der andere Teil der Acetonlösung wurde auf eine DC-Fertigplatte 25-UV 254 mit Silgurbeschichtung (Macherey-Nagel, Düren) aufgetragen und nacheinander in drei Fließmittelsystemen chromatographiert.

<u>System I</u>	<u>System II</u>	<u>System III</u>
30 ml Benzol	90 ml Äthylenchlorid	70 ml Chloroform
20 ml Essigester	16 ml Essigsäure	30 ml Methanol
		2 ml Essigsäure

Mit Hilfe von Phenylthiohydantoin-Standardgemischen konnten damit folgende Aminosäurederivate identifiziert werden:

Leu, Pro, Phe/Met, Trp, Tyr, Thr,
Ser, Ile, Val, Ala, Gly, Lys/AA-Cys,
Glu, Gln, Asp, Asn.

Die Identifizierung von Phe, Met, Lys und AA-Cys war nur in Kombination mit der Rückspaltung eindeutig.

16. Festphasenabbau (46)

Nach dieser Methode wurden Peptide mit C-terminalem Lysin, Aminoäthylcystein oder Homoserin abgebaut.

a) Kupplung von Lysin- und AA-Cystein-Peptiden an Aminopropylglas

100 - 500 nMol Peptid wurden 2mal in 5%igem Triäthyl-

amin (über Ninhydrin und anschließend über NaBH_4 destilliert) gelöst und jeweils im Vakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in 250 μl N-Methylmorpholin /TFA-Puffer pH 9,5 (N-Methylmorpholin - H_2O 1:1 mit TFA auf pH 9,5 justiert) gelöst, mit 5 mg Diisothiocyantat (Kodak) in 0,5 ml Dimethylformamid (Pierce sequanal grade) versetzt und mit Stickstoff begast. Nach 30 Minuten Inkubation bei 55°C wurden 50 mg Aminopropylglas (Pierce) hinzugefügt, eine Stunde bei 55°C inkubiert, danach nochmals 50 mg Aminopropylglas dazugegeben und eine weitere Stunde bei 55°C inkubiert.

Zur Blockierung der freien Aminogruppen wurden 0,2 ml Methylisothiocyantat-Acetonitril-Lösung (1:1) und 0,2 ml Sequenzpuffer pH 8,1 (N-Methylmorpholin - Trifluoracetat pH 8,1 - Pyridin 2:3) zugesetzt und 75 Minuten bei Raumtemperatur gerollt. Sodann wurde auf einer Fritte dreimal mit 2 ml getrocknetem Methanol gewaschen und unter Vakuum bei Raumtemperatur getrocknet.

Zur Analyse des Kupplungserfolges wurde 1 mg abgenommen und nach der Hydrolyse mit 6 N HCl auf den Aminosäureanalysator aufgegeben.

b) Kupplung von Homoserinlactonpeptiden

100 - 500 nMol Homoserinpeptid wurden in 1 ml trockener TFA gelöst. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurde die Probe tiefgefroren und im Hochvakuum eingetrocknet. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Die Peptidprobe wurde sodann in 100 μl Dimethylformamid gelöst und in ein Schliffreagenzglas überführt, das 100 mg Aminopropylglas, vorgequollen in 200 μl DMF, enthielt. Das erste Gläschen wurde sodann mit 100 μl DMF nachgewaschen und diese Lösung in das Schliffreagenzglas überführt. Sofort danach wurden 50 μl Triäthylamin hinzugefügt und 2 Stunden unter

gelegentlichem Umschwenken bei 45°C inkubiert. Wie zuvor wurden die freien Aminogruppen mit Methylisothiocyanat blockiert und das Glas auf einer Fritte mit getrocknetem Methanol gewaschen. 1 mg wurde zur Aminosäureanalyse abgenommen.

Die gekuppelten Peptide wurden mit 900 mg Glasperlen (240- 270 mesh Pierce) gemischt und in die Reaktionssäulen (Ø 2,8 mm) gefüllt.

Die gefüllten Säulen wurden sodann in den Sequemat 10K (Sequemat Inc., Watertown, Mass. USA) eingehängt, an die Thermostatisierung angeschlossen und die Peptide sodann dem automatischen Edman-Abbau unterworfen.

Bei der Sequenzierung von Peptiden, die mit der Diisothiocyanat-Methode an die Festphase gekuppelt wurden, war es meist nicht möglich, die aminoterminalen Aminosäure zu bestimmen, da diese, ebenso wie das C-terminale Lys oder AA-Cys, am Festkörper verblieben. Nur bei Peptiden mit mehreren Lysinen war es möglich, die zum Teil nicht gekuppelte aminoterminalen Aminosäure zu identifizieren. Bei vollständig sequenzierten Peptiden konnte die aminoterminalen Aminosäure aus der Differenz der Aminosäurezusammensetzung und den in der Sequenzanalyse gefundenen Aminosäuren bestimmt werden.

17. Flüssigphasen - Edmanabbau (47)

Größere Peptide der LDH-H₄ und -M₄ wurden in einem Sequenator (Beckmann Modell 890, Palo Alto, USA) automatisch abgebaut. Es wurde ein Programm verwendet, bei dem 0,1 M Quadrol - Puffer eingesetzt wurde und der Spaltungsschritt mit Heptafluorbuttersäure nur einmal durchgeführt wurde. Dieses Programm hatte wegen der geringen Quadrol-Konzentration den Vorteil, daß durch kürzere Waschvorgänge größere

Verluste an Peptidmaterial vermieden wurden. Mit 200 - 600 nMol Material konnten in diesem Gerät bis zu 60 Schritte durchgeführt werden, ohne daß die Identifizierung der abgespaltenen Aminosäurereste Schwierigkeiten bereitete.

Alle benutzten Chemikalien wurden entweder von Beckmann (Palo Alto, USA) oder Merck (Darmstadt) in Sequenatorqualität bezogen.

18. GC und DC der PTH-Aminosäuren.

Als Endprodukte beim schrittweisen Edmanabbau im Sequenator traten die instabilen Thiazolinonderivate der einzelnen abgespaltenen Aminosäuren auf. Zur Identifizierung wurden sie in 200 µl 20%iger Trifluoressigsäure in 20 Minuten bei 50°C in die stabileren Phenylthiohydantoin (PTH) - Derivate überführt. Aus der wässrigen TFA-Phase wurden sie dann mit zweimal 0,7 ml Essigester extrahiert und die vereinigten Extrakte mit Stickstoff im Wasserbad bei 40°C bis zur Trockene abgeblasen. Der Rückstand wurde sodann in 20 µl Essigester gelöst und Aliquote hiervon zur Identifizierung mittels GC, DC und Rückhydrolyse abgenommen.

a) Gaschromatographie der PTH Aminosäuren (48) .

In der Gaschromatographie konnten ohne Schwierigkeiten folgende Aminosäuren identifiziert werden: Ala, Gly, Val, Pro, Phe, Thr, Ile/Leu, Met, Tyr und Trp. Serin war nur in schlechten Ausbeuten zu erhalten. Tyrosin war nach Silylierung als Doppelpeak zu erkennen. Für die Silylierung wurde im " Sandwich - Verfahren " zuerst das Silylierungsmittel N-Methyl-N-trimethylsilyl-heptafluorbutyramid (MSHFBA, Macherey und Nagel, Düren BRD), dann die

Substanz im Volumenverhältnis 2:1 aufgezogen, sodaß das leichter verdampfende Silylierungsmittel die Probe im 250°C heißen Einlaßteil der Säule überholte.

Benutzt wurde eine 90 cm lange Säule, die mit Chromosorb WHP (100 - 200 mesh, mit 10% SP-400 als flüssiger Phase, Supelco Inc., Bellefonte, USA) gefüllt war.

Die Säulentemperatur wurde während des Laufes durch ein Temperaturprogramm von 180°C auf 275°C erhöht.

b) Dünnschichtchromatographie der PTH-Aminosäuren (49,50)

Bei der automatischen Sequenzanalyse wurde die Dünnschichtchromatographie mit den Systemen von G.Braunitzer et al und B.Wittmann-Liebold auf DC-Fertigplatten UV 254 (Merck) durchgeführt.

<u>System I</u>	<u>System II</u>	<u>System III</u>
Propionsäure- tert-Butylester (Fluka AG)	60 ml Dichlor- äthan 12 ml Eisessig	50 ml Dichlor- äthan 25 ml Äthanol

Mit Hilfe von drei PTH-Standardgemischen konnten damit alle 20 PTH-Aminosäuren identifiziert werden. PTH-Arginin und -Histidin verblieben während der Extraktion mit Essigester in der wässrigen Phase, wenn die Cyclisierung mit 1 N HCl durchgeführt wurde. Bei der hier angewandten Cyclisierung mit 20%-iger TFA konnten auch diese Aminosäurederivate aus der wässrigen Phase mit Essigester extrahiert und im dritten Fließmittelsystem identifiziert werden.

Der Rest wurde wie beim manuellen Edman-Abbau in der Rückspaltung quantitativ ausgewertet.

III. Peptidisolierung

1. Erster Versuch zur Isolierung der tryptischen Peptide nach Citraconylierung

608 mg AÄ-LDH- H_4 (17 μ Mol) wurden wie zuvor beschrieben citraconyliert und tryptisch verdaut. Der Verdauungsansatz wurde sodann in vier Chargen über eine Sephadex G-50-f-Säule (3x160 cm) in 0,05 M Triäthylammoniumacetatpuffer pH 8,5 vortrennt. Das Elutionsprofil ist in Abbildung 1 dargestellt. Es wurden acht Fraktionen nach den Ergebnissen der Detektion bei 280 und 578 nm gesammelt. Diese Fraktionen wurden mit T1 bis T8 (1. Ansatz) gekennzeichnet.

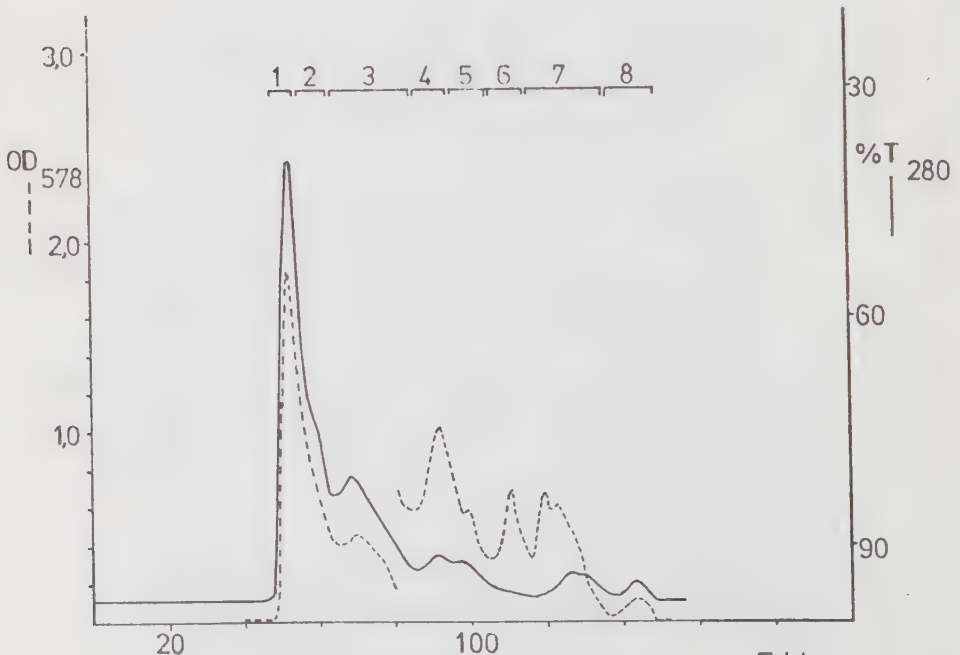


Abb. 1 : Vortrennung des tryptischen

Verdauungsansatzes der citraconylierten AÄ-LDH- H_4

Vor der weiteren Auftrennung wurden die acht Fraktionen dünnsschichtchromatographisch und diskelektrophoretisch untersucht.

Nach der Diskelektrophorese der Fraktionen T1 bis T5 (1. Ansatz) konnten nur in den Fraktionen T4 und T5 scharfe Banden ausgemacht werden.

Die Fraktionen T1 bis T3 zeigten eine Vielzahl von zum Teil sehr unscharfen Banden. Ein Versuch, aus diesem Material direkt Peptide zu isolieren, führte zu keinem Ergebnis.

In der Dünnschichtchromatographie der Fraktionen T5 bis T8 erschien eine Vielzahl von Flecken, was darauf schließen ließ, daß die Reduktion tryptischer Spaltstellen durch Citraconylierung in diesem Versuch nicht gelungen war.

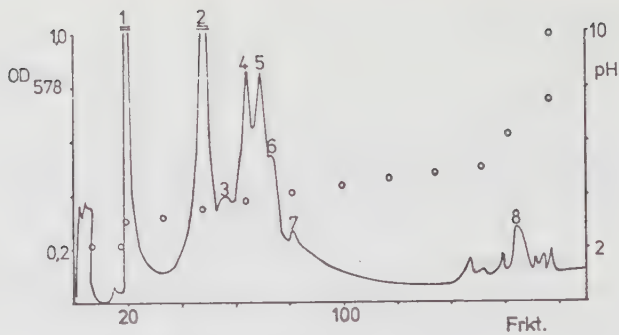
Die Fraktionen T4 bis T8 wurden über einen Kationenaustauscher (Technicon P) rechromatographiert (Abb. 2a-e).

Die aus diesen Rechromatographien isolierten Peptide sind in der Tabelle 1 aufgeführt.

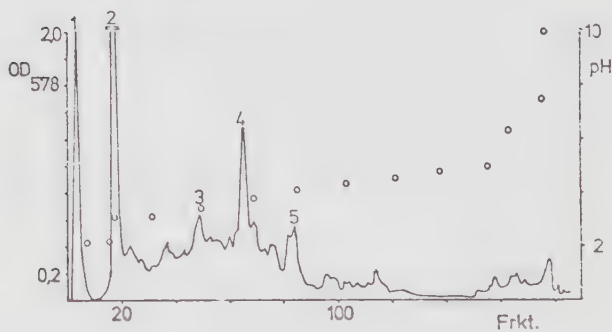
Die Kennzeichnung der Fraktionen der Austauschläufe erfolgte mit dem Buchstaben D. Die Numerierung der Peptide wurde nach der Reihenfolge, in der sie in der Sequenz auftraten, mit t1 bis t38 durchgeführt.

Aus der Fraktion T7-D8 konnten durch weitere Nachreinigung mittels präparativer Dünnschichtchromatographie zwei Peptide isoliert werden (T7-D8-1 und T7-D8-4).

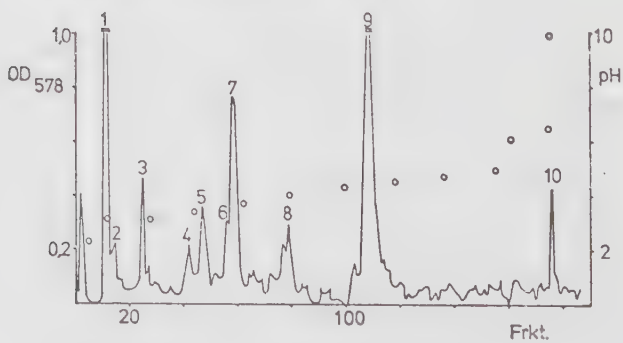
Wie schon die Rechromatographien obiger Fraktionen zeigten, waren bei diesem Ansatz nicht nur die erwünschten Argininpeptide sondern eine Vielzahl tryptischer Peptide entstanden, von denen sich einige durch Kationenaustauscherchromatographie reinigen ließen. Es war daher zu erwarten, wie auch schon das Ergebnis der Diskelektrophorese zeigte, daß das Material aus den Fraktionen T1 bis T3 dieses 1. Ansatzes sehr heterogen sein mußte.



T4 auf Technicon P



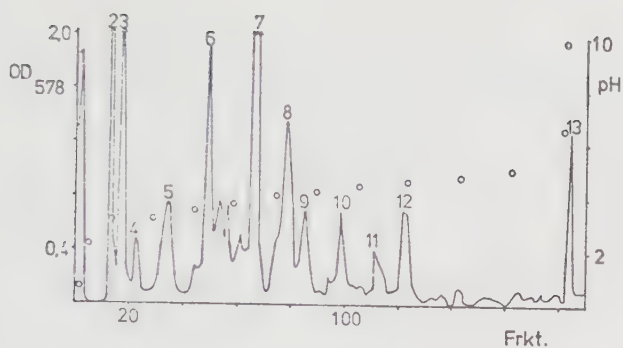
T5 auf Technicon P



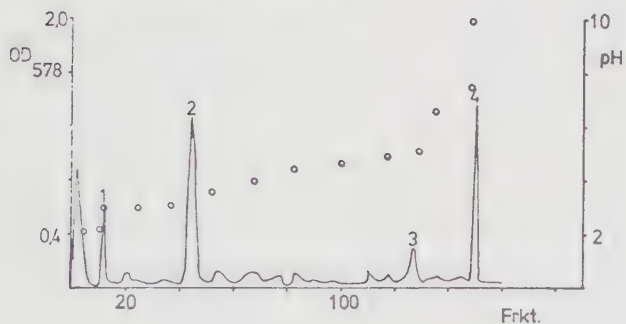
T6 auf Technicon P

Abb. 2a-c

Rechromatographie der Fraktionen T4-6 (1. Ansatz)
des Sephadex G-50-f Laufes



T7 auf Technicon P



T8 auf Technicon P

Abb. 2d-e

Rechromatographie der Fraktionen T7-8 (1. Ansatz)
des Sephadex G-50-f Laufes

Fraktion	T8-D2 T8-D4	T8-D2	T7-D3	T7-D4	T7-D5	T7-D6	T7-D7	T7-D8-1	T7-D8-4
ASP				1,0(1)		1,3(1)	1,0(1)	1,1(1)	
THR				0,9(1)		0,9(1)			
SER			1,1(1)			1,3(1)			
GLU			4,2(4)		0,7(1)	1,2(1)	1,0(1)		0,5(1)
PRO									
GLY			1,1(1)		1,2(1)	1,3(1)			
ALA					1,0(1)				1,0(1)
VAL					2,2(3)	0,7(1)	0,9(1)		
NET									
ILE					0,5(1)	0,7(1)	2,0(2)	1,0(1)	1,1(1)
LEU				1,0(1)		1,2(1)			0,8(1)
TYR									
PHE	1,0(1)								
HIS		0,9(1)							
LYS									
ARG	1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)		1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)		1,0(1)
Summe	2	2	6	2	9	9	6	3	6
% Ausb.	25	4,1	14,1	2,9	11,2	7,1	21,8	3,1	2,8
Peptid	t 22	t 19	t 12	t 38	t 11	t 33	t 13	t 37	t 23

Aminosäurezusammensetzung der tryptischen Peptide
aus den Rechromatographien der Fraktionen T4 bis
T8 (1. Ansatz).

Tabelle 1

Fraktion	T7-D9	T7-D10	T7-D11 T6-D3	T7-D12	T7-D13	T6-D7	T5-D4	T4-D2
ASP	1,6(2)	1,0(1)	2,0(2)	0,1(1)			3,5(4)	2,8(3)
THR						1,0(1)	1,0(1)	1,3(1)
SER	1,2(1)		2,0(2)	1,1(1)	0,9(1)		1,0(1)	2,1(2)
GLU						1,0(1)	1,3(1)	3,6(4)
PRO					0,6(1)			2,0(2)
GLY			2,2(2)		1,0(1)		1,2(1)	2,2(2)
ALA	1,0(1)	0,9(1)	1,0(1)			1,1(1)	1,2(1)	1,4(1)
VAL		0,7(1)	0,5(1)				0,7(1)	3,8(4)
MET								1,8(2)
ILE			0,3(1)				1,1(1)	1,8(2)
LEU	1,0(1)	0,9(1)	1,0(1)	1,0(1)	1,3(2)	1,2(1)	2,7(3)	3,5(4)
TYR								0,9(1)
PHE								0,9(1)
HIS								0,6(1)
LYS			0,9(1)		0,6(1)	2,0(2)	2,0(2)	0,7(1)
AA-CIS			1,0(1)	1,0(1)				0,8(1)
ARG	1,0(1)	1,0(1)			1,1(1)			1,0(1)
Summe	6	6	12	4	8	6	16	33
% Ausb.	6,5	6,5	17,7	9,4	4,1	8,8	1,2	7,1
Peptid	t 21	t 32	t 20-21	t 30	t 18-19	t 1-2	t 36-38	t 31-32

Daher entschloß ich mich, die Fraktionen T1 bis T3 des 1. Ansatzes zu vereinigen, im Säuren zu decitraconylieren und sodann den gesamten Rest einer tryptischen Hydrolyse zu unterwerfen.

Die decitraconylierten (bei pH 3 in 6h bei Raumtemperatur) und lyophilisierten Proben wurden in 50 ml 0,2 M N-Äthylmorpholinacetatpuffer pH 8,5 (0,1% Thiodiglycol, 0,02% NaN_3 und 3 mM Ca^{++}) suspendiert und mit 8 mg gereinigtem Rindertrypsin (in 0,3 ml n/1000 HCl gelöst) versetzt (Enzym-Substrat Verhältnis 1:50). Nach 2,5 Stunden wurden nochmals 5,5 mg Trypsin hinzugefügt und weitere 3 Stunden bei 37°C verdaut.

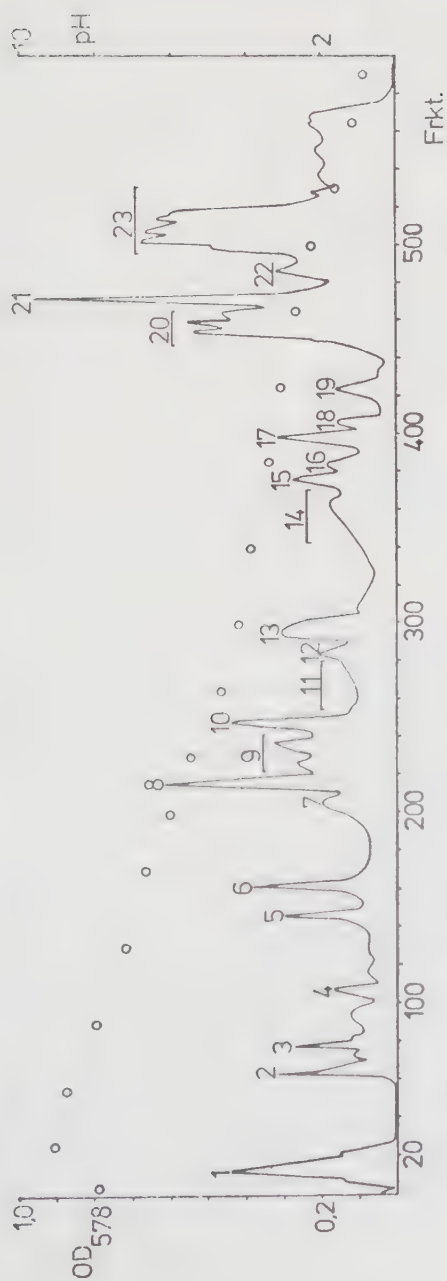
Sodann wurde der Ansatz mit verdünnter Natronlauge auf pH 9,5 eingestellt und auf einer Anionenaustauschersäule nach Hilschmann aufgetrennt (1,2x120 cm). (Abb. 3)

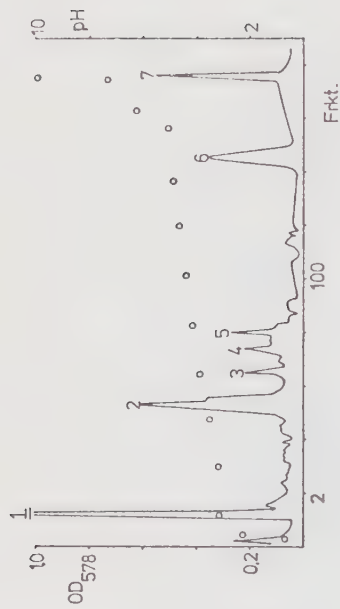
Die Rechromatographie der getrennten Fraktionen T1-3 (1. Ansatz) A1-24 erfolgte bis pH 4 über die Technicon-P-Säule, unter pH 4 nochmals über eine Dowex 1x2-Säule (0,6x60 cm).

Aus den Abbildungen 4a bis 4j und der Tabelle 2 ist ersichtlich, daß sich auf diese Weise noch eine Reihe weiterer, zum Teil bisher noch nicht bekannter Peptide isolieren ließen.

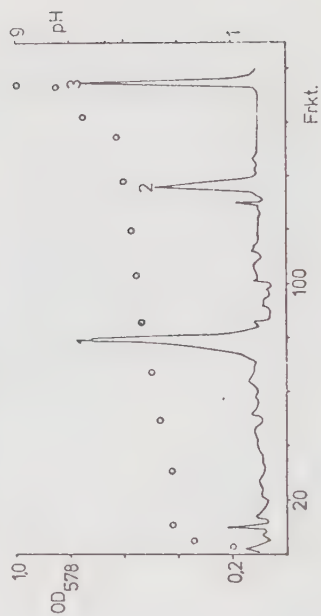
Abb. 3

Rechromatogramme des 1. Ansatzes nach 1. und 2. Nachverdaung auf Dowex 1x2 (1,2x120 cm)

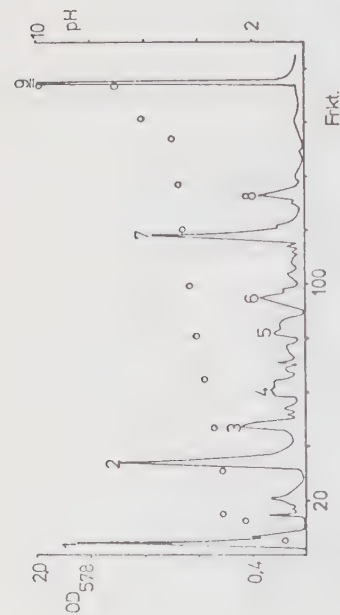




4b Fraktion A2+3 auf Technicon P



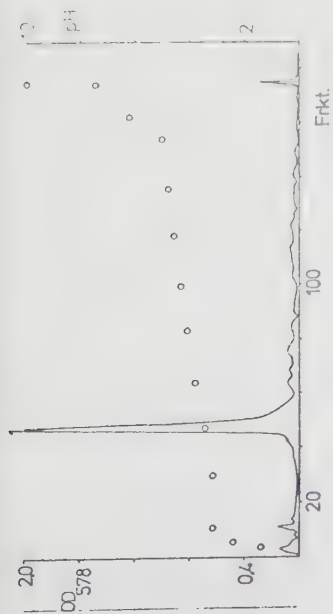
4d Fraktion A6 auf Technicon P



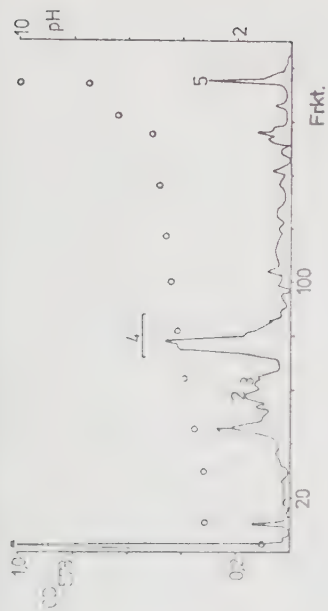
4a Fraktion A5 auf Technicon P



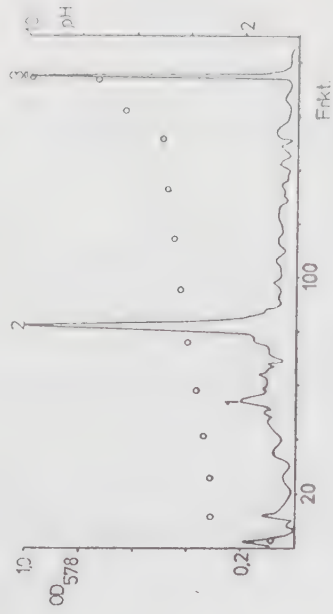
4c Fraktion A3 auf Technicon P



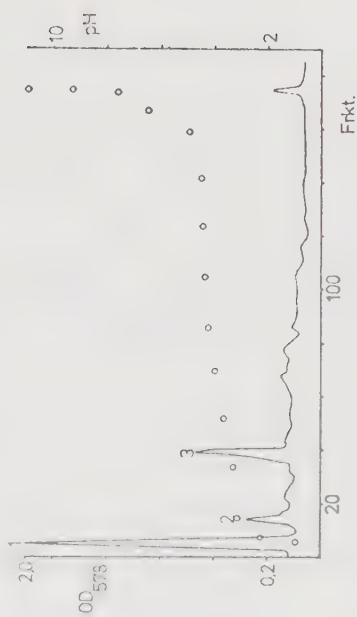
4e Fraktion A8 auf Technicon P



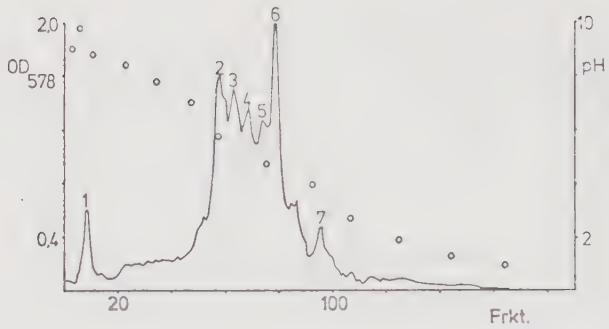
4f Fraktion A9 auf Technicon P



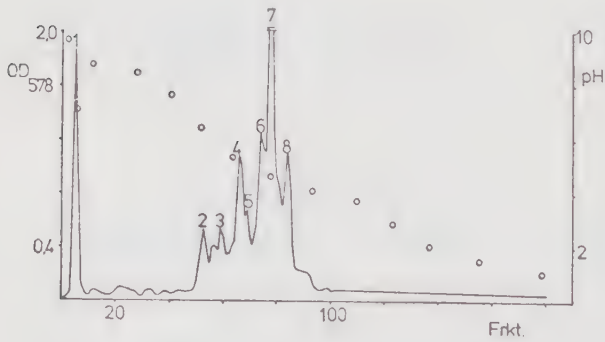
4g Fraktion A10 auf Technicon P



4h Fraktion A11-13 auf Technicon P



4i Fraktion A14-16 auf Dowex 1X2



4j Fraktion A17-19 auf Dowex 1X2

Abb. 4a-j

Rechromatographie der Fraktionen A1-19 des
Dowex 1X2 Laufes (Abb. 3)

Fraktion	A2+3-D3	A2+3-D6	A2+3-D7	A5-D4+5	A6-D1	A6-D2	A8-D1	A9-D4
ASP					1,1(1)		1,4(1)	
THR							1,0(1)	
SER	0,8(1)		0,9(1)				1,3(1)	
GLU				1,0(1)		1,1(1)	2,7(3)	1,2(1)
PRO	0,9(1)						1,1(1)	
GLY	1,1(1)						1,9(2)	
ALA								0,9(1)
VAL				0,7(1)			1,2(2)	0,8(1)
MET								
ILE					0,7(1)		2,5(3)	1,1(1)
LEU	1,8(2)	1,0(1)					0,8(1)	
PHE				0,7(1)			0,6(1)	
HIS				1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)
LYS	1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)					
Summe	6	2	2	4	3	2	17	6
% Ausb.	1,4	4,1	2,4	11,2	11,8	21,8	7,1	25,0
Peptid	t 18	t 7 t 28 t 34	0-term. t 10	t 26	t 37	t 2	t 8	t 23

Tabelle 2 Fortsetzung

Fraktion	A10-D1	A10-D2	A11-13-D1 A12-14-D2	A11-12-D1	A11-13-D1	A11-14-D1 A21	A11-15-D1 A21
ASP	1,8(2)	2,1(2)	1,2(1)		1,1(1)	1,1(1)	1,1(1)
THR	0,5(1)		1,1(1)		1,1(1)	1,1(1)	1,1(1)
SER	1,1(1)		1,1(1)		1,1(1)	1,1(1)	1,1(1)
GLU	1,2(1)	2,1(1)	1,1(1)		1,1(1)	1,1(1)	1,1(1)
PRO	1,2(1)		1,1(1)		1,1(1)	1,1(1)	1,1(1)
GLY	1,1(1)		1,1(1)		1,1(1)	1,1(1)	1,1(1)
ALA		1,1(1)	1,1(1)	1,1(1)	1,1(1)	1,1(1)	1,1(1)
VAL		1,1(1)	1,1(1)	1,1(1)	1,1(1)	1,1(1)	1,1(1)
MET					1,1(1)	1,1(1)	1,1(1)
ILE	0,5(1)		1,1(1)		1,1(1)	1,1(1)	1,1(1)
LEU	1,2(1)	2,1(2)	1,1(1)		1,1(1)	1,1(1)	1,1(1)
TYR			1,1(1)		1,1(1)	1,1(1)	1,1(1)
HIS					1,1(1)	1,1(1)	1,1(1)
LYS	1,0(1)	2,1(2)	1,1(1)	1,1(1)	1,1(1)	1,1(1)	1,1(1)
TRP	+ (1)				1,1(1)	1,1(1)	1,1(1)
Summe	14	11	15		17	14	14
% Ausb.	2,4	12,1	31,5	1,2	4,7	35,5	21,5
Peptid	t 30	t 34-35	t 3	t 27	t 20	t 6	t 25

*20h-Hydrolyse **40h-FAS-Hydrolyse

Tabelle 2 Fortsetzung

2. Zweiter Versuch und Isolierung der Argininpeptide

Wie die Ergebnisse des ersten Versuches zeigten, war es mir nicht gelungen, die erwünschten gro-
ßen Fragmente (= Argininpeptide) zu isolieren.
Eine mögliche Fehlerquelle war das mehrmalige
Umlipophilisieren der citraconylierten AA-LDH-H_4 ,
die sich jedesmal schlechter löste. Aus der Li-
teratur war zudem zu entnehmen, daß diese Modi-
fizierung auch bei pH 8,5 nicht völlig stabil
ist. (32)

So entschloß ich mich, die Bedingungen für den
nächsten Versuch so zu verändern, daß ein Erfolg
gewährleistet sein sollte. Dazu wurde die "doppelte"
Citraconylierung eingeführt. Dies war deshalb un-
umgänglich, weil die denaturierte und aminoäthy-
lierte LDH-H_4 nur noch in 8 M Harnstoff löslich
war und die Citraconylierung in diesem Medium
durchgeführt werden mußte. Die Abtrennung des
Harnstoffs und der überschüssigen Citraconsäure
bei pH 8,5 über Sephadex G-25 dauerte aber mit an-
schließender Gefriertrocknung zwei Tage, in denen
die Möglichkeit der Decitraconylierung bestand.
Daher wurde das Lyophilisat nach der Gelchro-
matographie direkt in verdünntem Verdauungspuf-
fer pH 8,5 gelöst, abermals citraconyliert und
nach 30 Minuten direkt eine Stunde lang tryptisch
verdaut.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von Essigsäure
bis unter pH 3 gestoppt, wobei gleichzeitig de-
citraconyliert wurde. Der Ansatz wurde sodann
mit Wasser verdünnt und gefriergetrocknet.

Jeweils ein Viertel dieses zweiten Ansatzes wur-
de in Ameisensäure gelöst und in 30%-iger Essig-
säure über eine Sephadex G-50-f-Säule (3x150 cm)
vorgetrennt. (Abb. 5)

Die einander entsprechenden Fraktionen T1 bis T9
(2. Ansatz) aus den vier Läufen wurden gesammelt

und vor der weiteren Auftrennung diskelektrophoretisch und dünnschichtchromatographisch untersucht.

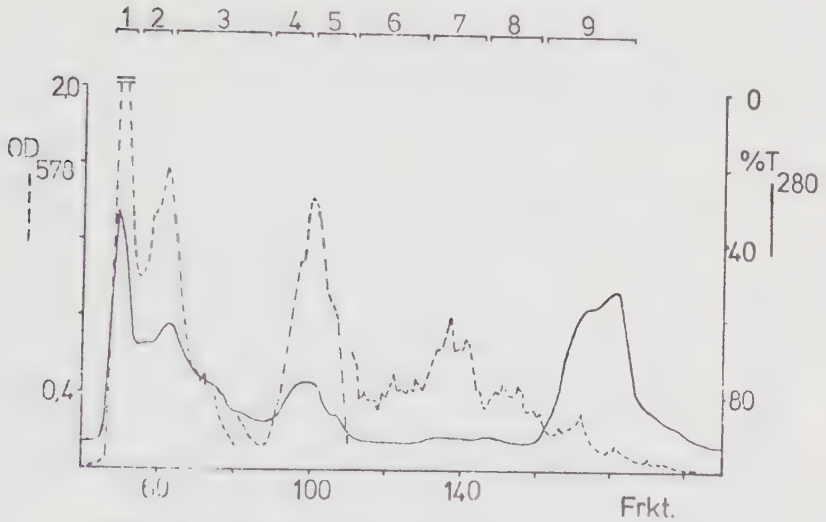


Abb. 5 : Vortrennung der tryptischen Peptide der citraconylierten LDH-H₄ auf Sephadex G-50-f in 30%-iger Essigsäure. Für die Detektion bei 578 nm wurden bis Fraktion 80 50 μ l, von 80-110 100 μ l und ab 111 200 μ l entnommen. (2. Ansatz)

a) Trennung der kleinen Argininpeptide

Ebenso wie im ersten Versuch wurden die Fraktionen T6 bis T8 der zweiten Aufarbeitung über die Technicon-P-Säule rechromatographiert. (Abb. 6a-c) In der Fraktion T9 ließ sich nach der Hydrolyse eines Aliquots in der Aminosäureanalyse nur noch das Dipeptid Phe-Arg ausmachen. In den Fraktionen T6 bis T8 wurden nur noch die Fragmente CTVI, CTII, CTIII und CTV gefunden. Alle diese Fragmente enthielten jeweils ein Arginin. Die Zusammensetzung dieser Peptide ist aus der Tabelle 3 zu ersehen.

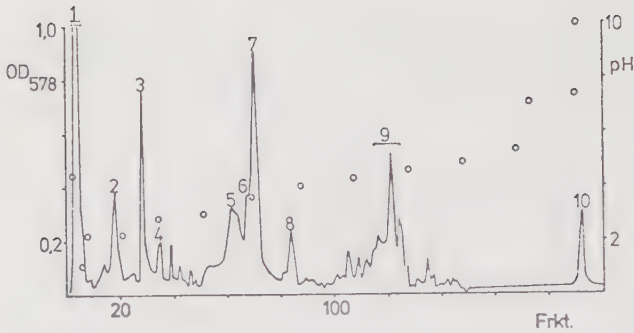


Abb.6a Fraktion T6 auf Technicon 1

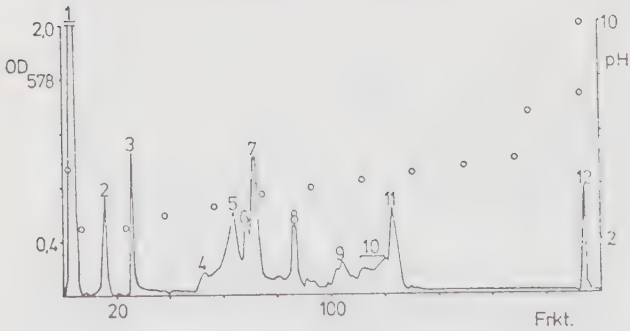


Abb.6b Fraktion T7 auf Technicon P

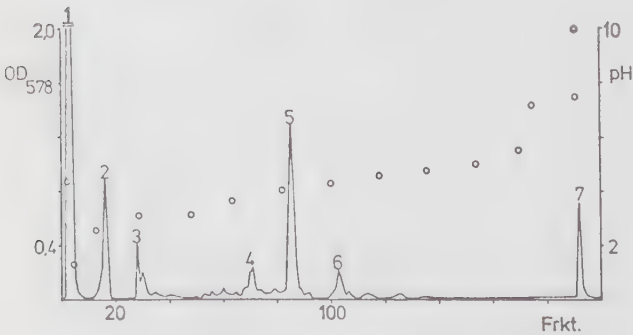


Abb.6c Fraktion T8 auf Technicon P

Abb. 6a-c : Rechromatographie der kleinen Arginin-peptide. (2. Ansatz)

Fraktion	T T5-D4+ T7-D10	T8-D1	T8-D5 T7-D8 T1-D8	T8-D6 T7-D7+11 T1-D7+11
ASP			1,1(1)	2,2(2)
SER		1,1(1)		2,2(2)
GLU		2,5(4)	1,0(1)	
GLI		1,1(1)		2,2(2)
ALA				1,1(1)
VAL			1,0(1)	0,4(1)*
ILE				0,4(1)*
LEU			1,8(2)	1,0(1)
PRO	1,1(1)			
ARG-III				0,8(1)
ARG	1,1(1)	1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)
Summe	2	2	2	12
Anal.	1,1(1)	1,1(1)	1,1(1)	1,1(1)
Peptid	CTVI	CTII	CTIII	CTV

* 20%-Hydrolyse

Tabelle 3: Aminosäurezusammensetzung der kleinen Argininpeptide. (2. Ansatz)

Die Benennung der tryptischen Fragmente nach Citraconylierung wurde, beginnend am Aminoterminus mit CTI bis zum Carboxylende mit CTIX, fortlaufend durchgeführt.

b) Trennung der Fragmente CTVIII und CTIX

Nach der Diskelektrophorese und der Aminosäureanalyse der ausgeschnittenen Banden konnten in den Fraktionen T4 und T5 nur zwei Peptide unterschiedlicher Aminosäurezusammensetzung identifiziert werden. Ihr Molekulargewicht lag zwischen 3000 und 3500. In der Fraktion T4 war dabei vor-

nehmlich das Peptid CTIX enthalten, das als einziges kein Arginin aufwies und somit der C-Terminus der LDH-H₄ sein mußte. Die Fraktion T5 enthielt in der Hauptsache das schon im ersten Versuch isolierte CTVIII-Peptid (t₃₁₋₃₂).

Da bei der Vortrennung des Gesamtverdauungsansatzes eine gewisse Trennung dieser beiden Fragmente zu beobachten war, wurden die Fraktionen T4 und T5 zusammen über Sephadex G-50 superfine in 30%-iger Essigsäure rechromatographiert. (Abb. 7)

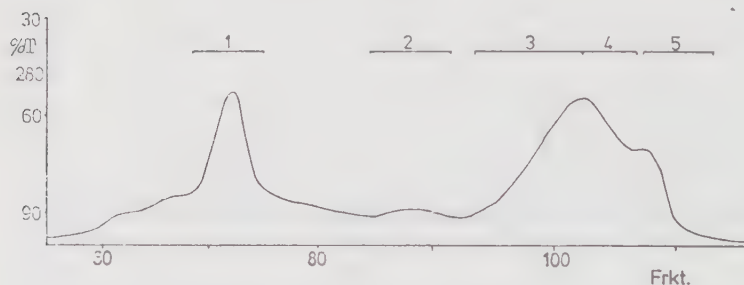


Abb. 7 : Rechromatographie der Fraktionen T4 und T5 (2.Ansatz) auf Sephadex G-50 superfine in 30%-iger Essigsäure.

Hierbei konnte aus der Fraktion 3 das Fragment CTIX und aus der Fraktion 5 das Fragment CTVIII isoliert werden. Das Fragment CTIX war bei dieser Arbeit von geringerem Interesse, da der C-terminale Bereich der LDH-H₄ schon von Mella (51) und Kiltz (29) erarbeitet worden war.

Dagegen war das Fragment CTVIII für die Zuordnung der BrCN-Peptide sehr wichtig, da es zwei Methionine enthielt, durch die die drei C-terminalen BrCN-Fragmente überlappt wurden.

In der Tabelle 4 sind die Aminosäurezusammensetzungen der beiden Fragmente CTVIII und CTIX angegeben.

Aminosäure	P Dis.-mol.	P + S -7	P Dis.-mol.	P + S -7
ASP	1,1(1)	1,2(1)	1,1(1)	1,1(1)
THR	1,1(1)	1,2(1)	1,1(1)	1,1(1)
SER	1,1(1)	1,2(1)	1,1(1)	1,1(1)
ALA	1,1(1)	1,2(1)	1,1(1)	1,1(1)
PRO	1,1(1)	1,2(1)	1,1(1)	1,1(1)
GLI	1,1(1)	1,2(1)	1,1(1)	1,1(1)
ALA	1,1(1)	1,2(1)	1,1(1)	1,1(1)
VAL	1,1(1)	1,2(1)*	1,1(1)	1,1(1)*
LEU	1,1(1)	1,2(1)	1,1(1)	1,1(1)
ILE	1,1(1)	1,2(1)*	1,1(1)	1,1(1)*
LEU	1,1(1)	1,2(1)*	1,1(1)	1,1(1)
THR	1,1(1)	1,2(1)	1,1(1)	1,1(1)
PHE	1,1(1)	1,2(1)	1,1(1)	1,1(1)
HIS	1,1(1)	1,2(1)	1,1(1)	1,1(1)
LYS	1,1(1)	1,2(1)	1,1(1)	1,1(1)
AA-MIS	0,5(1)	0,6(1)	0,5(1)	0,6(1)
ARG	1,1(1)	1,2(1)	1,1(1)	1,1(1)
Summe		22	22	22
Ausb.		1,5		n.best.
Peptid	CTVIII	CTVIII	CTIX	CTIX

* 20h-Hydrolyse

Tabelle 4: Aminosäurezusammensetzung der Peptide
CTVIII und CTIX

c) Trennung der Fragmente CTI, CTIV und CTVII

Aus den Fraktionen T1 bis T3 der zweiten Aufarbeitung ließen sich durch Aminosäureanalyse der Banden aus den verschiedenen Diskelektrophoresen zwei ungefähr gleichgroße Peptide mit einem Molekulargewicht um 10 000 identifizieren.

Eine Bilanz der bis dahin gefundenen Fragmente ergab, daß ungefähr 40 Aminosäuren immer noch fehlten. Da sich aber in den Fraktionen T4 und T5 kein weiteres Fragment mehr nachweisen ließ, vermutete ich, daß sich dieses Peptid in den ersten drei Fraktionen befinden müßte.

Als mögliche Ursache wurde angenommen, daß dieses Material sehr stark zur Aggregation neigte und daher zusammen mit den größeren Fragmenten von der Sephadex G-50-f-Säule in 30%-iger Essigsäure eluiert wurde.

Die Fraktionen T1 bis T3 wurden daraufhin in 70%-iger Ameisensäure auf Sephadex G-50-f (3x160 cm) rechromatographiert. Die nachfolgenden Elutionsprofile der Fraktionen T1 bis T3 zeigten, daß außer den beiden großen Fragmenten, die gleichzeitig eluiert wurden, Material mit niedrigerem Molekulargewicht auftrat (Abb. 8a-c).

Die Aminosäureanalyse der niedermolekularsten Fraktion ergab, daß es sich hierbei um das gesuchte Fragment handeln mußte. Schon vorher hatte W. Keil in seiner Dissertation ⁽³⁰⁾ über die tryptischen Peptide der LDH-M₄ ein solches Peptid beschrieben, das sich ebenso durch einen besonders hohen Prolin-Gehalt auszeichnete. Die manuelle Sequenzanalyse der ersten Stufen bestätigte später, daß die aminoterminale Sequenz dieses Peptides mit dem aus der LDH-M₄ gefundenen nahezu übereinstimmte.

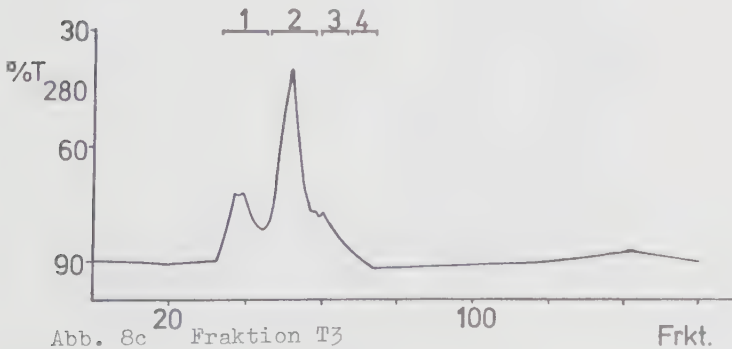
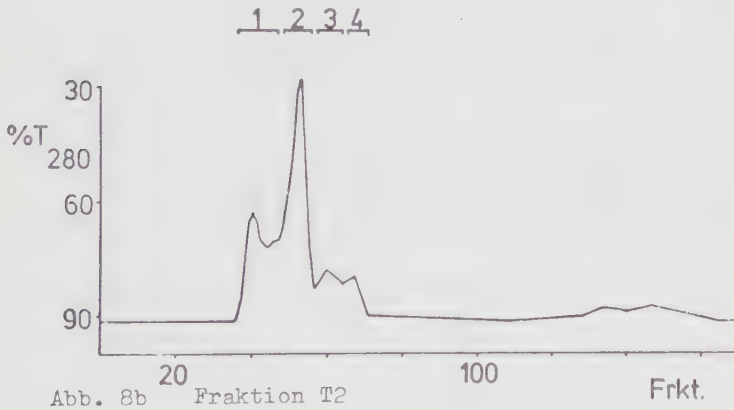
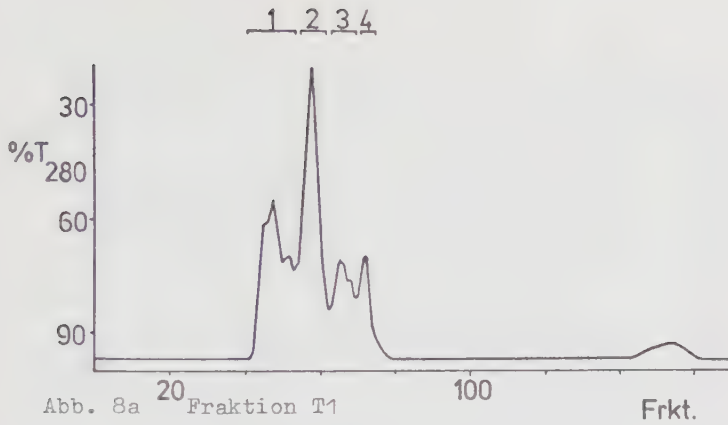


Abb. 8a-c : Rechromatographie der Fraktionen T1-3 auf
Seph. G 50-f in 70%-iger Ameisensäure.
(2. Ansatz)

Die verbliebenen zwei Fragmente wurden bei der Gel-chromatographie in 70%-iger Ameisensäure wegen ihres fast gleichen Molekulargewichtes nicht getrennt. Zunächst wurde versucht, diese Trennung auf Bio-rex-70 mit einem Pyridinacetatgradienten von 0,2 bis 2M zu erreichen, was bei den großen Fragmenten der LDH-M₄ zum Erfolg führte, aber hier nicht gelang.

Erst die Anwendung eines Stufengradienten mit steigenden Konzentrationen an Ameisensäure führte zum Erfolg (Abb. 9).

Mit 60%-iger Ameisensäure eluierte reines Peptid CTVII, bei 100%-iger Ameisensäure eluierte zunächst ein Gemisch; aus der anschließenden Schülter ließ sich dann nicht ganz reines Peptid CTI isolieren.

Die Aminosäurezusammensetzung der aus den Fraktionen T1 bis T5 des zweiten Ansatzes gewonnenen Peptide ist der Tabelle 5 zu entnehmen.

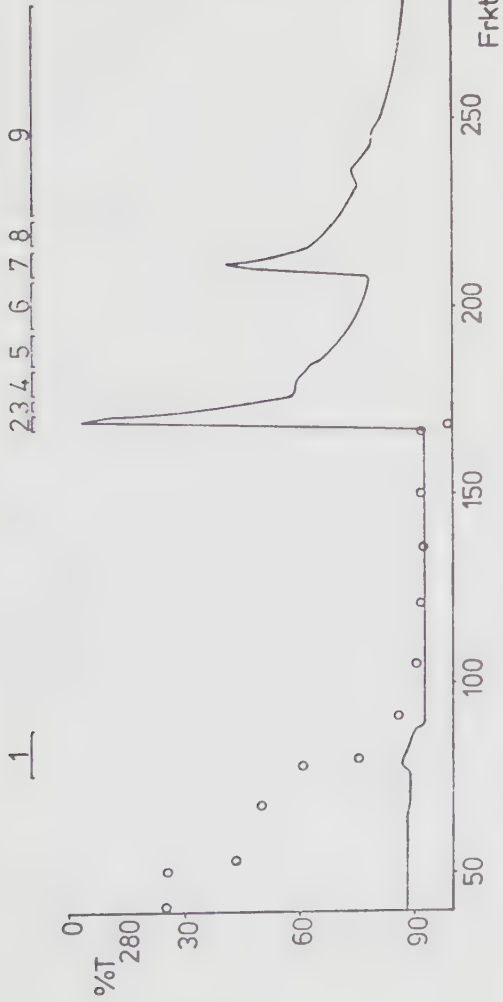


Abb. 3: Rechromatographie der Fraktionen T1-2, T2-2 und T3-2 auf Biorex-70 mit einem Ameisensäurestufengradienten.

Fraktion	P1 -70	P1-7 Disk-30	BR-70 -	P1-7 Disk-30	BR-70 -7
ASF	4,8(5)	10,6(11)	10,1(10)	10,0(10)	10,0(10)
THR	2,0(2)	7,5(8)	5,8(6)	3,7(4)	2,4(2)
SER	3,0(3)	7,0(7)	7,0(7)	9,7(10)	10,2(10)
GLU	1,2(1)	11,2(11)	10,0(10)	10,9(11)	9,5(10)
PRO	3,8(4)	3,0(3)	2,5(3)	2,6(3)	1,6(2)
GLY	1,3(1)	8,0(8)	7,4(7)	8,6(9)	7,8(8)
ALA	0,5(1)	8,9(9)	6,7(7)	6,8(7)	5,2(5)
VAL	6,2(7)*	11,1(11)	9,6(10)*	9,6(10)	7,9(8)*
MET		2,9(3)	2,6(3)	3,3(4)	3,5(4)
ILE	4,3(5)*	5,4(6)*	5,0(5)*	3,3(3)	3,1(3)*
LEU	3,3(4)*	11,3(11)	9,9(10)*	10,3(10)	9,2(10)*
TYR	1,7(2)	1,4(1)	1,4(1)	2,5(3)	2,1(3)
PHE	1,7(2)	1,0(1)	1,4(1)	0,5(1)	0,3(-)
HIS	0,9(1)	1,3(1)	1,8(2)	2,5(3)	3,0(3)
LYS	3,0(3)	7,6(8)	5,8(6)	5,7(6)	4,9(5)
AM-CTS	1,4(1)	1,2(1)	0,5(1)	0,6(1)	0,4(1)
TRP	+				+
ARG	1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)	0,0(1)
Summe	4,6	10,1	10,1	10,1	8,5
% Ausb.	1,0		1,0		4,5
Peptid	CTIV	CTI	CTI	CTVII	CTVII

* 20h-Hydrolyse

Tabelle 5: Aminosäurezusammensetzung der Peptide CTIV, CTI und CTVII.

IV. Sequenzanalyse

Die in der nachfolgenden Tabelle 6 aufgeführten Peptide wurden zum Teil in unserem Labor dem manuellen Edmanabbau unterworfen, zum größeren Teil habe ich am Lehrstuhl für Genetik in Köln bei K.Beyreuther sowohl mit dem dort vorhandenen Festphasensequenator der Firma Sequemat als auch mit dem Flüssigphasensequenator der Firma Beckmann die Sequenzanalysen durchgeführt.

Während sich meine Arbeit bei der Peptidisolierung auf die tryptischen Peptide der LDH-H₄ des Schweines konzentrierte, habe ich in der Sequenzanalyse auch Peptide erarbeitet, die von W.Keil während seiner Dissertation aus der LDH-M₄⁽³⁰⁾ und von H.H.Kiltz⁽²⁹⁾ aus der Schweine-LDH-H₄ und -M₄ isoliert wurden. Dabei handelte es sich bei W.Keil, ebenso wie bei mir, um tryptische Peptide, bei H.H.Kiltz um BrCN-Fragmente.

Bei der manuellen Sequenzierung in Bochum wurden die einzelnen Stufen durch DC der PTH-Aminosäuren und Aminosäureanalysen der rückgespaltenen PTH-Derivate identifiziert. Zunächst erfolgte diese Rückspaltung mit Jodwasserstoffsäure, wodurch es nicht möglich war, Methioninreste zu erfassen. Der Einsatz von 6 N HCl/ 0,1% SnCl₂⁽⁴⁵⁾ konnte auch dieses Problem lösen. Die Rückspaltung ermöglichte eine quantitative Auswertung und erwies sich gerade in höheren Abbaustufen bei der automatischen Sequenzierung als unentbehrliches Hilfsmittel.

Beim automatischen Edmanabbau in Köln wandte ich zusätzlich die Gaschromatographie der PTH-Aminosäuren an, die durch ihre Schnelligkeit eine gute Kontrolle des Abbauverlaufes ermöglichte.

Peptid	amino acids	erreichte Stufenzahl	Methode
H4 t1	11-11	1	manuell
H4 t2	11-11	1	"
H4 t11	11-11	1	"
H4 t8	11-11	1	"
H4 t27	223-234	1	"
H4 t18-19	151-151	1	"
H4 t3	11-11	1	"
H4 CTVII	113-157	10	"
H4 CTIV	113-157	10	"
H4 t25	186-228	2	CF _{A+B} -Kinetik
H4 t6	43-57	15	Festphasen- abbau
H4 CTIV	113-157	34	"
*H4 BVII t3	11-11	1	"
*H4 BVII t4	11-11	1	"
*H4 BVII t5-4	11-11	1	"
*H4 BVIII t3	11-11	1	"
*H4 BV t4	11-11	1	"
*H4 BIII	11-11	1	"
H4 CTVII	113-157	0	Flüssigphasen- abbau
H4 CTVIII	223-234	15	"
*H4 bX	64-174	60	"
**H4 CTII t4	11-11	8	Festphasen- abbau
**H4 CTII t5	11-11	12	"
**H4 CTII t3	11-11	6	"
**H4 CTIV	113-157	40	"
**H4 CTIV t4	150-155	5	"
**H4 CTI t4	178-185	2	"
**H4 CTI t3	186-212	20	"
**H4 CTI t3-9	213-269	10	"
**H4 CTI t5-9	229-269	23	"
*H4 BIX	64-174	36	Flüssigphasen- abbau

* Peptide wurden von H.H.Kiltz isoliert.

** Peptide wurden von W.Keil isoliert.

Tabelle 6: Übersicht der sequenzierten Peptide der LDH-H4
und -M4 des Schweines.

In der nachfolgenden Beschreibung der Sequenzen werden die einzelnen Stufen wie folgt gekennzeichnet:

└ : Identifizierung durch DC-

└ : Identifizierung durch Rückspaltung

└ : Identifizierung durch GC-

Peptid H₄ t23

Sequenz: 1 2 3 4 5 6
 Tyr-Leu-Met-Ala-Glu-Lys
 └ └ └ └ └ └
 ─BX──└──└BV───

Dieses Peptid überlappt die BrCN-Fragmente BX und BV der LDH-H₄.

Peptid H₄ t5

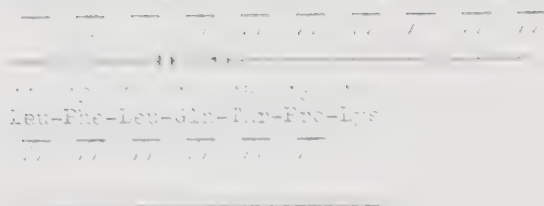
Sequenz: 1 2 3 4 5 6 7
 Ala-Ile-Ser-Ile-Leu-Gly-Lys
 └ └ └ └ └ └ └

Peptid H₄ t11

Sequenz: 1 2 3 4 5 6 7 8 9
 Ile-Val-Val-Val-Thr-Ala-Gly-Val-Arg
 └ └ └ └ └ └ └ └ └

Die Analyse des Arginins wurde nach der achten Abbaustufe direkt auf dem Aminosäureanalysator durchgeführt.

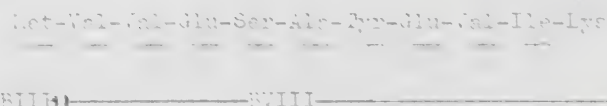
Sequenz:



Dieses Peptid konnte bis Stufe 10 sequenziert werden. Das bei der BrCK-Spaltung der LDH-H₂ auftretende freie Homoserin, entsteht aus Methionin konnte somit in die Sequenz eingeordnet werden. Zudem reiht dieses Peptid die BrCK-Fragmente BVI - B1 - BIX aneinander.

Peptid H₂ t²

Sequenz:



Das Peptid H₂ t² ist das einzige tryptische Peptid der LDH-H₂ mit aminoterminalen Methionin.

Da es möglich war, alle BrCK-Fragmente der LDH-H₂ zu isolieren und dabei nur ein Peptid mit C-terminaler Lys-Homoserin-Sequenz gefunden wurde, überlappt dieses Peptid, wenn auch nur mit einer Aminosäure, die BrCK-Fragmente BIII und BVIII.

Peptid H₄ t18-19

Sequenz: 1 2 3 4 5 6 7 8
 Leu-Ser-Gly-Leu-Pro-Lys-His-Arg
 // // // // // // //

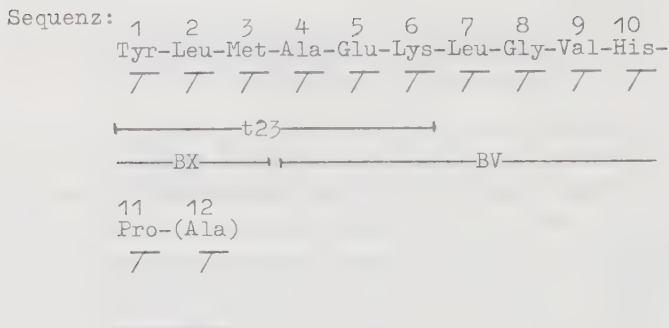
Die Identifizierung des Arginins erfolgte nach der 7. Stufe durch direkte Aminosäureanalyse. Das Serin in der 2. Stufe konnte nur in der Rückspaltung als Alanin identifiziert werden. Da aber in der Summenzusammensetzung des Gesamtpeptides kein Alanin vorhanden war, war die Einordnung des einzigen Serinrestes eindeutig möglich.

Peptid H₄ t3

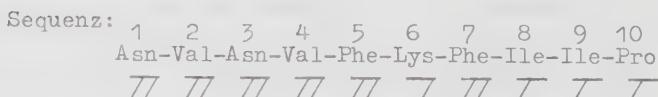
Sequenz: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
 Leu-Ile-Ala-Pro-Val-Ala-Gln-Gln-Glx-Thr-
 // // // // // // // // //

11 12 13
 Thr- ? -Pro
 // //

Dieses Peptid konnte eindeutig nur bis Stufe 11 sequenziert werden und wurde daher später noch dem Festphasenabbau unterworfen. In der Stufe 9 war es nicht möglich eindeutig anzugeben, ob es sich um Glutaminsäure oder Glutamin handelte. Das Prolin in der Stufe 13 konnte in der Rückspaltung identifiziert werden. In der Stufe 12 konnte kein Aminosäurerest gefunden werden.

Peptid H₄ CTVII

Das Peptid CTVII konnte manuell bis zur Stufe 12 ansequenziert werden. Da zur Identifizierung nur die Rückspaltung angewandt wurde, sind die 4., 5. und 12. Stufe nicht mehr eindeutig, da unter Rückspaltungsbedingungen sowohl aus Serin als auch aus AÄ-Cystein Alanin entsteht. Das Alanin in Position 4 und die Glutaminsäure in Position 5 sind insofern eindeutig, als daß das Peptid t23, das den Aminoterminus von dem Fragment CTVII darstellt, schon vorher sequenziert wurde und dünnschichtchromatographisch Alanin und Glutaminsäure nachgewiesen wurden.

Peptid H₄ CTIV

Auch das Peptid CTIV konnte nur bis zur 10. Stufe manuell ansequenziert werden. Dabei diente die Ansequenzierung dieses und des Peptides CTVII vor allem der Kontrolle, ob ein Edmanabbau möglich war, da beide noch dem automatischen Edmanabbau unterworfen werden sollten.

Peptid H₄ t25

Sequenz:

C-terminal Trp-Lys

Das Peptid t25 kommt aus dem Bereich des essentiellen Histidinpeptides. Es ist nach den experimentellen Ergebnissen das größte tryptische Peptid und enthält laut Aminosäureanalyse etwa 40 Aminosäurereste. Bei der Reinigung mittels präparativer Diskelektrophorese ist vermutlich der Aminoterminus blockiert worden, da weder der manuelle Edmanabbau noch eine Aminopeptidaseverdauung zu einem Ergebnis führten.

Eine Verdauung mit Carboxypeptidase-A und -B ermöglichte nach einer Zeitstudie nur die sichere Zuordnung der beiden letzten C-terminalen Aminosäuren.

CP-A und -B Kinetik

t(min)	5	10	20	
Ala	0,5	1,7	2,5	Die Einheiten sind in nM Aminosäure pro 10 nM eingesetztes Peptid angegeben.
Val	1,1	2,3	4,1	
Leu	1,5	1,9	2,4	
Lys	<u>5,2</u>	5,6	5,7	
Trp	4,0	<u>5,5</u>	7,0	

Peptid H₄ t6

Sequenz: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
 Ser-Leu-Thr-Asp-Glu-Leu-Ala-Leu-Val-Asp-
 / / / / / / / / / /
 11 12 13 14 15
 Val-Leu-Glu-Asp-Lys
 / / / /

In der ersten Stufe erschien in der Rückspaltungsanalyse Alanin. Da das Peptid laut Aminosäureanalyse nur ein Alanin enthielt, das sich eindeutig in der Position 7 identifizieren ließ, mußte das einzige Serin dieses Peptides aminoterminal stehen.

Peptid H₄ CTIV

Sequenz: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
 Asn-Val-Asn-Val-Phe-Lys-Phe-Ile-Ile-Pro-
 // // // // // T // // //
 11 12 13 14 15 16 17 18 19* 20
 Glu-Val-Phe-Pro-Ile-Asn-Pro-Phe-Ile-
 // // // T // T // T T
 21 22 23 24 25* 26 27 28 29 30
 Ile-Ile-Val-Val-Ser-Asn-Pro-Val-Asx-Ile-
 T T // // T // // // T
 31 32 33 34 35 36 37
 Val-Val-Phe-Ile-Ala-Pro-Ile-
 // T T T

* in der GC kein Ala.

Das Peptid H₄ CTIV ließ sich nur in sehr schlechter Ausbeute (12% ± 80 nM) an Aminopropylglas kuppeln. Somit war es nicht möglich, das nächste Lysin, das in Position 37 (in Homologie zur LDH-M₄) zu erwarten war, zu erreichen. In Position 16 wurde eine Mikroheterogenität festgestellt, und zwar standen Threonin und Serin im Verhältnis 1:2. Die Positionen 19 und 25 konnten nur in der Rückspaltungsanalyse als Alanin identifiziert werden; da aber weder in der DC noch in der GC Alanin vorhanden war, ist die obige Schreibweise in Homologie zur LDH-M₄ eindeutig. Die Position 30 konnte nur in der GC identifiziert werden, wobei nicht zwischen Ile und Leu unterschieden werden konnte. In Homologie zur LDH-M₄ wurde in die Sequenz Ile eingesetzt.

Peptid H₄ BVII t3

Sequenz: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
 Leu-Ile-Ala-Pro-Val-Ala-Gln-Gln-Glu-Thr-
 T T T T T T T T T T

11 12 13 14 15 16
 Thr-Ile-Pro-Asn-Asx-Lys
 T T T T T

Dieses Peptid ist identisch mit dem schon zuvor manuell ansequenzierten Peptid H₄ t3. Dieses Mal konnten zusätzlich die Positionen 9, 12, 14 und 15 erfaßt werden. Die Position 15 konnte nur in der Rückspaltungsanalyse bestimmt werden, in der nicht zwischen Asn und Asp unterschieden werden konnte.

Peptid H₄ BVII t4

Sequenz: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
 Ile-Thr-Val-Val-Gly-Val-Gly-Gln-Val-Gly-HSE
 T T T T T T T T T T

Das Glutamin in Stufe 8 konnte durch kombinierte Thermolysin/Carboxypeptidase-A-Verdauung verifiziert werden. Da das Peptid laut Aminosäureanalyse kein Ser und Asp enthält, ist die Aminosäureanalyse, in der Ser, Asn und Gln zur gleichen Zeit eluiert werden, ein eindeutiges Kriterium. Bei der Verdauung mit Thermolysin/Carboxypeptidase-A wurden aus 20 nM Peptid 19,4 nM HSE, 20 nM Gln, 13,4 nM Gly und 11,8 nM Val freigesetzt.

Peptid H₄ BVII t3

Sequenz:

Leu-Ile-Asp-Ile-Val-Ala

Durch einen Defekt am Festphasensequenzator konnte dieses Peptid nur sechs Stufen weit sequenziert werden. Laut Aminosäurezusammensetzung sind in diesem Peptid die beiden vorhergehenden Peptide H₄ BVII t3 und H₄ BVII t4 enthalten. Da der Amino-terminus dieses Peptides mit dem vom Peptid H₄ BVII t3 identisch ist, ist damit die Reihenfolge der beiden Peptide festgelegt.

Peptid H₄ BVIII t3

Sequenz:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Gly-Tyr-Thr-Asn-Trp-Ala-Ile-Gly-Leu-Ser

11 12 13 14 15 16 17 18
Val-Ala-Asp-Leu-Ile-Glu-Ser-HSE

Peptid H₄ BV t4

Sequenz:

1 2 3 4 5 6
His-Gly-Trp-Ile-Leu-Gly

Dieses Peptid konnte nur ansequenziert werden, da das Gerät nach der 6. Stufe defekt wurde. Die Sequenz dieses Peptides konnte später aus der Sequenzanalyse des Peptides H₄ CTVII ermittelt werden.

Peptid H₄ BIII

Sequenz: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
 Gly-Thr-Asp-Asn-Asp-Ser-Glu-Asn-Trp-Lys-
 // // // // // // // // //

11 12 13 14 15
 Glu-Val-His-Lys-HSE
 // // // //

————BIII t2————

Dieses Peptid wurde bereits in der Staatsexamensarbeit von K. Petry sequenziert. Die automatische Sequenzanalyse führte zum selben Ergebnis. Vor allem konnte die Position 11 (Glu) verifiziert werden. Das Tetrapeptid Glu-Val-His-Lys war nach der tryptischen Subfragmentierung erst mit 0,5 N NaOH vom Kationenaustauscher eluiert worden und ließ so eine sichere Bestimmung nicht mehr zu.

Peptid H₄ CTVII

Sequenz: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
 Tyr-Leu-Met-Ala-Glu-Lys-Leu-Gly-Val-His-
 // // // // // // // //

————BX————

11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
 Pro-Ser-Ser-Cys-His-Gly-Trp-Ile-Leu-Gly-
 // // // // // // // //

————BV————

21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
 Glu-His-Gly-Asp-Ser-Ser-Val-Ala-Val-Trp-
 // // // // // // // //

31 32 33 34 35 36 37 38 39 40
 Ser-Gly-Val-Asn-Val-Ala-Gly-Val(Ser)Leu-
 // // // // // // // // // //

41 42 43 44 45 46 47 48 49 50
 Gln-Gln-Leu-Asn-Pro-Glx-Met-Gly-Thr-Asx
 // // // // // // // // //

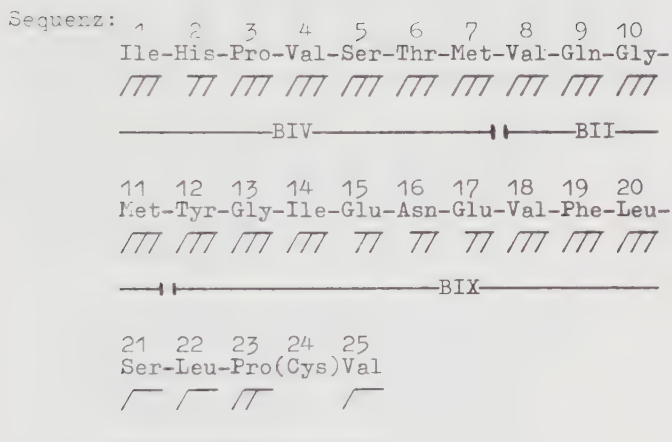
—————→ ←BIII—————

Das Peptid H_4 CTVII ist das zweitgrößte Fragment der LDH- H_4 und enthält vier Methionin- und vier Histidinreste.

Nach der Summenanalyse dieses Peptides ließen sich nur drei Histidinreste nachweisen, was auf die beiden His-Gly-Sequenzen in diesem Peptid zurückgeführt werden könnte.

Nach Homologiebetrachtungen mit der Dornhai LDH- M_4 wurde das zweite Methionin in der Position 44 erwartet. Das Ergebnis der Sequenzanalyse erbrachte ein zusätzliches Tripeptid in den Positionen 37-39, das in der Dornhai LDH- M_4 nicht vorhanden ist.

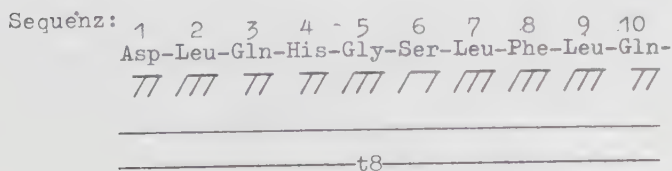
Dadurch verschob sich das zweite Methionin nach Position 47, in der es durch Rückhydrolyse nachgewiesen werden konnte. Die drei folgenden Aminosäuren stellen den Aminoterminus des BrCN-Fragments BIII dar. Somit war es möglich, mit der Sequenzierung der ersten 50 Stufen dieses Peptides die BrCN-Fragmente BX - RV - BIII miteinander zu verknüpfen. Die Position 39 (Ser) ist insofern unsicher, als nicht zwischen Val und Ser unterschieden werden konnte. In Homologie zur Schweine LDH- M_4 wurde an dieser Stelle ein Serin eingesetzt.

Peptid H₄ CTVIII

Dieses Peptid war wegen seiner beiden Methioninreste in Position 7 und 11 besonders wichtig. Die einzelnen BrCN-Fragmente waren schon von H.H.Kiltz in ihrer Primärstruktur aufgeklärt worden. Die Sequenzierung dieses Peptides sollte die bisher nur in Homologie zur LDH-M₄ vorgenommene Einordnung in die Gesamtsequenz bestätigen.

Dabei war es möglich, die Positionen 15- 17 eindeutig zu bestimmen, deren Säureamidgehalt bei der Sequenzierung des BrCN-Fragments nicht sicher zu ermitteln war.

Die Sequenz dieses Peptides reihte die BrCN-Fragmente BIV - BII - BIX aneinander.

Peptid H₄ BX

11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
 Thr-Pro-Lys-Ile-Val-Ala-Asn-Lys-Asp-Tyr-
 // // T // // // T T T

—————CTI—————

21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
 Ser-Val-Thr-Ala-Asn-Ser-Lys-Ile-Val-Val-
 // // // // T // T T T T

—————

31 32 33 34 35 36 37 38 39 40
 Val-Thr-Ala-Gly-Val-Arg-Gln-Gln-Glu-Gly-
 // // // // // T T T T T

—————CTII—————

—————t11—————

41 42 43 44 45 46 47 48 49 50
 Glu-Ser-Arg-Leu-Asn-Leu-Val-Glu-Arg-Asn-
 // // T // // // // T //

—————CTIII—————

51 52 53 54 55 56 57 58 59 60
 Val-Asn-Val-Phe-Lys-Phe-Ile-Ile-Pro-Gln
 // T // // T // // T //

—————CTIV—————

Das Peptid H₄ BX ist das größte BrCN-Fragment der LDH-H₄ und enthält 6 der 8 Argininreste der Sequenz. Da es mir in meiner Arbeit nicht möglich war, die beiden tryptischen Peptide zwischen den Positionen 14 und 27 zu isolieren, konnte dieser Sequenzbereich nunmehr aufgeklärt werden. Das Hauptanliegen bei der Sequenzierung dieses Peptides lag in dem Versuch, möglichst viele Argininreste zu

erreichen, um so die in ihrer Sequenz schon bekannten Argininpeptide in die Primärstruktur einordnen zu können. Die Sequenzierung mit dem Flüssigphasensequenator ermöglichte es, dieses Ziel weitgehend zu verwirklichen. So konnten die Peptide CTI - CTII - CTIII - CTIV sowie t8 und t11 in die Sequenz eingeordnet werden.

Peptid M₄ CTII t3

Sequenz: 1 2 3 4 5 6 7 8
 Glu-Glu-His-Val-Pro-His-Asn-Lys
 — // // // // // //

Die Summenzusammensetzung dieses Peptides erlaubte für die beiden amino- und carboxylterminalen Aminosäuren nur die angegebenen Positionen. Für die Annahme eines Glutaminsäurerestes statt Glutamin spricht die ansonsten unter den Isolierungsbedingungen zu beobachtende Cyclisierung zur Pyrrolidoncarbonsäure, die einen Edmanabbau nicht ermöglicht hätte. Außerdem wurde bei der manuellen Sequenzierung die erste Stufe als Glu bestätigt.⁽²⁹⁾

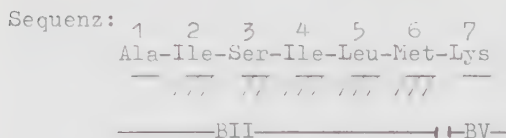
Peptid M₄ CTII t4

Sequenz: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
 Ile-Thr-Val-Val-Gly-Val-Gly-Ala-Val-Gly-
 // // // // // // / / / /
 —————BV—————

11 12 13
 Met-Ala-Cys
 / /
 —||—BII—

Von diesem Peptid wurden 100 nM in die Kupplungsreaktion eingesetzt und 30 nM am Glasträger gebunden. Bis zur Stufe 6 war die Sequenz noch dünn-schichtchromatographisch zu verfolgen. Danach wurden bis zur Stufe 12 nur noch Rückspaltungsanalysen durchgeführt. Da das Peptid über das C-terminale AA-Cystein am Träger befestigt war, konnte es in Stufe 13 nicht mehr nachgewiesen werden. Die Identifizierung der beiden Alanine in den Positionen 8 und 12 war eindeutig, da in der Summenzusammensetzung dieses Peptides kein Serin gefunden worden war. Außerdem überlappt dieses Peptid die beiden BrCN-Fragmente BVI und BII der LDH-M₄.

Peptid M₄ CTII t5



Nach der Aminosäurezusammensetzung bestand dieses Peptid aus 7 Aminosäuren. Das C-terminale Lysin kann beim Festphasenabbau nicht identifiziert werden. Auch die aminoterminal Aminosäure ist gerade bei kleineren Peptiden durch die Anheftung an das bifunktionelle Kupplungsreagenz nicht zu ermitteln. Da in diesem Falle alle Aminosäurereste bis auf Alanin in der Sequenzanalyse erscheinen, bleibt für das noch fehlende Alanin nur die aminoterminal Position.

Das Peptid überlappt die BrCN-Fragmente BII und BV der LDH-M₄.

Peptid M₄ CTIV

Sequenz: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
 Asn-Val-Asn-Ile-Phe-Lys-Phe-Ile-Ile-Pro-
 // // // // // / // // // //

11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
 Asn-Ile-Val-Lys-Tyr-Ser-Pro-Asn-Cys-Lys-
 // // // / // // // / /

21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
 Leu-Leu-Val-Val-Ser-Asn-Pro-Val-Asp-Ile-
 / / / / / // // // //

31 32 33 34 35 36 37 38
 Leu-Thr-Tyr-Val-Ala-Trp-Lys-Ile
 // / // // // / / /

Das Peptid ließ sich zu fast 100% an den Glasträger kuppeln und konnte bis Stufe 38 sequenziert werden. Die Stufe 19 wurde schon beim direkten manuellen Edmanabbau als Cystein identifiziert. Da es sich laut Aminosäureanalyse um das einzige Cystein handelt, ist auch die Position 25 (Serin) eindeutig nachgewiesen. Aus dem erhöhten Glycin- und Alaningehalt in der Stufe 36 wurde auf Tryptophan geschlossen, das schon in der Aminosäureanalyse nach Mercaptoäthansulfonsäure- Hydrolyse in diesem Peptid nachgewiesen wurde.

Peptid M₄ CTIV t6

Sequenz: 1 2 3 4 5 6
 Ile-Ser-Gly-Phe-Pro-Lys
 // // // //

In der Aminosäureanalyse des am Glas gekuppelten Peptides war der Isoleucingehalt nur noch ein Fünftel so groß wie bei der Analyse des ungekuppelten Peptides. Schon daraus war zu schließen, daß sich dieser Aminosäurerest aminoterminal befinden müßte. Da bei der Sequenzanalyse des Peptides kein Isoleucin zu identifizieren war, kommt dieser Aminosäure die angegebene Position zu.

Peptid M₄ CTI t1

Sequenz: 1 2 3 4 5 6 7 8
 Leu-Gly-Val-His-Pro-Leu-Ser-Cys
 / / / / / / /

Das Peptid besteht laut Aminosäureanalyse aus 8 Aminosäuren und ist damit vollständig sequenziert. Das C-terminale AA-Cystein bleibt beim Festphasenabbau am Träger und ist nicht direkt nachweisbar.

Peptid M₄ CTI t2

Sequenz: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
 His-Gly-Trp-Ile-Leu-Gly-Glu-His-Gly-Asp-
 / / / / / / / / / /

11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
 Ser-Ser-Val-Pro-Val-Trp-Ser-Gly-Val-Asn-
 / / / / / / / / / /

21 22 23 24 25 26 27
 Val-Ala-Gly-Val-Ser-Leu-Lys
 / / / / / /

Bei diesem Peptid der LDH-M₄ war der Histidin- und Glycingehalt in der Aminosäureanalyse um jeweils einen Aminosäurerest niedriger als hier in der Sequenzanalyse. Das Peptid H₄ CTVII, das aus demselben Bereich der Sequenz kommt, zeigte für Histidin und Glycin dasselbe Verhalten. Ebenso wie in der LDH-H₄ wurden in diesem Peptid in den Positionen 23- 25 drei zusätzliche Aminosäurereste gefunden, die in der bekannten Sequenz der Dornhai LDH-M₄ fehlen.

Die Positionen 17 und 25 (Serin) sind eindeutig bestimmt, da weder in der GC noch in der DC Alanin nachzuweisen war.

Peptid M₄ CTI t3-9

Sequenz: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
 Asn-Leu-His-Pro-Glu-Leu-Gly-Thr-Asp-Ala-
 T // // // // // // // //

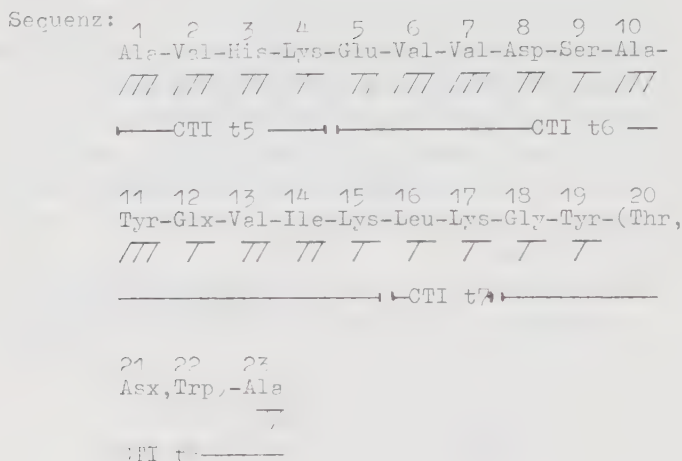
—————CTI t3 —————

11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
 Asp-Lys-Glu-His-Trp-Lys-Ala-Val-His-Lys
 // T // // // T // // //

—————CTI t4 —————CTI t5 —————

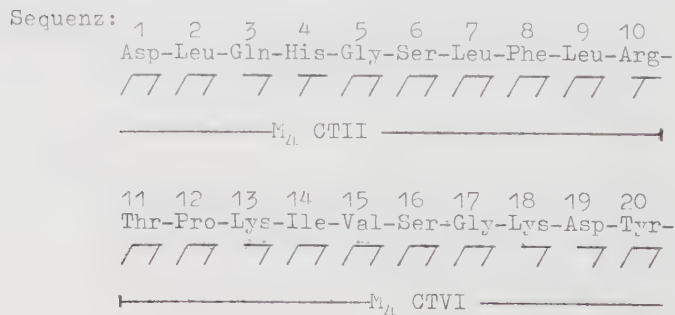
Mit dieser Teilsequenz werden das Peptid M₄ CTI t3+4, das bereits von W. Keil sequenziert wurde, und M₄ CTI t5 aneinandergereiht.

Peptid M_{II} BIX



Die Stufen 20- 22 sind durch einen Defekt im Aminosäureanalysator verlorengegangen. In Klammern ist daher die vermutliche Sequenz laut Summenzusammensetzung in Homologie zur LDH-H_L eingetragen worden. Mit der Sequenzierung dieses Peptides können alle tryptischen Subfragmente des Peptides M_{II} CTI in der korrekten Reihenfolge angeordnet werden.

Peptid M_{II} BIX



21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
 Asn-Val-Thr-Ala-Asn-Ser-Arg-Leu-Val-Val-
 / / / / / / / / / /

31 32 33 34 35 36
 Ile-Thr-Ala-Gly-Ala-Arg
 / / / / / /

—M₄ CTVIII —

Das Peptid M₄ BIX enthält 8 der 11 Argininreste der Schweine-LDH-M₄. Bei diesem Sequenatorlauf sollte versucht werden, ebenso wie bei der LDH-H₄ mit dem Peptid BX, möglichst viele dieser Arginine zu überlappen. Da bei dem Gerät ab Stufe 32 eine Hochvakuumpumpe ausfiel, ließ sich die Sequenz gas- und dünnschichtchromatographisch nur bis Stufe 36 verfolgen. Die Stufen 4 (His), 10 (Arg), 27 (Arg) und 36 (Arg) wurden zusätzlich in der Rückspaltungsanalyse identifiziert.

V. Diskussion

1. Peptidisolierung

Bei der LDH-H₄ des Schweines handelt es sich um ein globuläres Protein aus vier identischen Unter-einheiten mit je ungefähr 330 Aminosäuren. Zur Stabilisierung während der Spaltungen und der Sequenzierungen wurden die jeweils fünf Cysteinreste aminoäthyliert.

Wie schon die Versuche von Mella (62), Böhn (53) und Keil (30) gezeigt hatten, war es nicht möglich, alle bei der direkten tryptischen Verdauung entstehenden Peptide zu isolieren. Dabei war es besonders auffallend, daß bestimmte Peptide bei fast jeder Aufarbeitung in hohen Ausbeuten anfielen, während andere niemals in reiner Form zu erhalten waren. Eine Ursache mag die Schwerlöslichkeit der nicht gefundenen Peptide sein; eine andere ist zweifelsohne in der chymotryptischen Nebenaktivität käuflicher Trypsinpräparationen zu suchen, die auch noch nach TPCK-Behandlung nachzuweisen ist (33). Dadurch wird aber die Zahl der zu trennenden Peptide noch größer.

In Zusammenarbeit mit K. Jany wurde daher Trypsin durch Affinitätschromatographie so weit gereinigt, daß auch ohne TPCK-Behandlung bei der Verdauung der LDH-H₄ keine chymotryptischen Peptide mehr entstanden (33).

Da es aus dem vorher Gesagten nicht sehr aussichtsreich erschien, aus einem tryptischen Verdauungsansatz der LDH-H₄ alle gewünschten Peptide zu erhalten, wollte ich versuchen, die tryptischen Spaltstellen durch Modifizierung der ε-Aminogruppen der Lysine und Aminoäthylcysteine auf die verbleibenden 8 Argininreste zu reduzieren. Die Auftrennung der dann zu erwartenden 9 Fragmente sollte leichter durchführbar sein.

Viele Arbeitsgruppen haben dazu die Maleylierung⁽⁵⁴⁾ angewandt, die aber den großen Nachteil hat, nur durch sehr drastische Säurebehandlung reversibel zu sein. Dies birgt zweierlei Gefahren in sich; zum einen werden säurelabile Aminosäuren (z. B. Asn, Gln, Trp) desamidiert oder sogar völlig zerstört, zum andern können unerwünschte Peptidspaltungen auftreten (z.B. an Asx-Gly). Als Alternative hierzu bot sich die Citraconylierung⁽³²⁾ (3-Methylmaleinsäure) an, die ebenso wie die Maleylierung den basischen Charakter der ϵ -Aminogruppen umpolt, aber unter sehr viel mildereren Bedingungen reversibel verläuft. Ein weiterer großer Vorteil dieser Modifizierung war die gute Löslichkeit der LDH-H₄ und die dadurch bedingte kurze Verdauungszeit.

Im ersten Versuch gelang es nicht, die Citraconylierung methodisch in den Griff zu bekommen. Trotzdem konnten mit Hilfe von Gel- und Austauschchromatographie ungefähr 70 % der tryptischen Peptide der Schweine LDH-H₄ isoliert werden (siehe Tabelle 1 und 2).

Nach der Einführung der " doppelten " Citraconylierung konnte auch diese Schwierigkeit überwunden werden. So gelang es mir im zweiten Versuchsansatz, die tryptischen Argininpeptide der LDH-H₄ zu erhalten. Besonders auffällig war dabei das Verhalten der Fragmente CTI, CTIV und CTVII (s. Abb. 5). Alle drei eluierten auf der Sephadex G-50-f-Säule in 30%iger Essigsäure im Ausschlussvolumen und zeigten damit ihre Neigung zur Aggregation. Gerade das kleinste dieser Peptide (CTIV mit 45 Aminosäuren) eluierte vornehmlich in der ersten Fraktion und konnte nur in 70%iger Ameisensäure von den höhermolekularen Fraktionen mittels Gelchromatographie abgetrennt werden (s. Abb. 8a-c).

2. Die methioninhaltigen Peptide

Ein Ziel meiner Arbeit war es, die methioninhaltigen Peptide der LDH-H₄ zu isolieren und zu sequenzieren, um auf diese Weise die Zuordnung der BrCN-Fragmente dieses Enzyms durchzuführen.

Es gelang mir, aus dem ersten Versuchsansatz drei dieser Peptide zu isolieren und in ihrer Sequenz aufzuklären. Mit Hilfe dieser Peptide (t8, t23 und t27) konnten die BrCN-Fragmente BVI-BI-BX-BV und BIII-BVIII einander in der Sequenz zugeordnet werden. Die Sequenzanalyse der beiden Fragmente CTVII und CTVIII ermöglichten die Erfassung dreier zusätzlicher Methioninreste.

Die Festlegung von insgesamt 7 der in der LDH-H₄ vorkommenden 9 Methionine erlaubte eine eindeutige Zuordnung der BrCN-Fragmente.

t8 Gly-Glu-Met-Met-Asp-Leu-Gln-His-

————BVI————BI————BX————

t27 Met-Val-Val-Gln-Ser-Ala-Tyr-

BIII————BVIII————

t23 Tyr-Leu-Met-Ala-Glu-Lys

————BX————BV————

CTVII Tyr-Leu-Met-Ala-Glu- - - Gln-Met-Gly-Thr-

————BX————BV————BIII————

CTVIII Ile-His-Pro-Val-Ser-Thr-Met-Val-Gln-Gly-Met-

————BIV————BII————

Tyr-Gly-Ile-

————BIX————

Das Fragment H_4 BVII ist als einziges der BrCN-Fragmente dem Edman-Abbau nicht zugänglich und muß somit aminoterminal stehen, da der Aminoterminus der Schweine-LDH- H_4 acetyliert ist (Diplomarbeit W. Keil).

Das Fragment BIX enthält kein Homoserin und endet daher mit dem Carboxylterminus.

Daraus ergibt sich die Reihenfolge der BrCN-Fragmente der LDH- H_4 eindeutig wie folgt:

BVII-BVI-BI-BX-BV-BIII-BVIII-BIV-BII-BIX

3. Die Primärstruktur der Schweine-LDH- H_4

Die Aufklärung von ca. 79% der Primärstruktur der Schweine-LDH- H_4 ermöglichte es, zusammen mit den schon bekannten Bereichen, die von H.H.Kiltz (29) mit Hilfe der BrCN-Fragmente ermittelt worden waren, die Aminosäuresequenz des gesamten Enzyms zu erstellen.

Dabei konnten in den Positionen 128 (Ser), 183 (Ser) und 196 (Ser) Mikroheterogenitäten festgestellt werden, da in der Rückhydrolyse der PTH-Aminosäure dieser Abbaustufen auch jeweils etwas α -Aminobuttersäure auftrat, die aus Threonin entsteht. Ebenso konnte in der Position 140 (Val) auch etwas Alanin nachgewiesen werden. Weitere Mikroheterogenitäten in der LDH- H_4 ließen sich nicht feststellen, was zum Teil auf die Empfindlichkeit der angewandten Methode zurückzuführen war.

Die Position 142 (Ile) konnte nur mit Hilfe der Gaschromatographie identifiziert werden, in der keine Unterscheidungsmöglichkeit zwischen Ile und Leu bestand. In Homologie zur Schweine-LDH- M_4 wurde in die Sequenz Ile eingesetzt.

Die Positionen 147 - 149 (Ala-Trp-Lys) konnten beim Edman-Abbau nicht mehr erfaßt werden und wurden entsprechend der Aminosäuresummenzusammensetzung in Homologie zur LDH-M₄ eingeordnet. Ebenso wurde das Dipeptid Phe-Arg (170- 171) homolog zur LDH-M₄ zugeordnet.

Die Numerierung der LDH-H₄ erfolgte durchgehend, da das Schweineenzym nach den Ergebnissen der bisher bekannten LDH-Sequenzen mit 333 Aminosäureresten die längste Kette darstellt. Zudem wurden die Positionen 208 -210 erstmals in unserer Arbeitsgruppe gefunden und fehlen in der bekannten Sequenz der Dornhai-LDH-M₄⁽⁵⁵⁾. Dadurch entfallen Deletionen und Insertionen, die nach der von M.G. Rossmann aus der Röntgenstrukturanalyse abgeleiteten Numerierung notwendig wurden.

Infolgedessen verschieben sich die Positionen der essentiellen Aminosäurereste vor der Nummer 211 um zwei Stellen nach vorn, Tyr 83 (85), Arg. 99 (101), Cys 163 (165), Arg 169 (171) und His 193 (195) und danach um zwei Stellen nach hinten, Tyr 239 (237).

In der nachfolgenden Erörterung wird die ursprünglich nach der Röntgenstrukturanalyse durchgeführte Numerierung jeweils in Klammern mit angeführt.

Die Bereiche der Sequenz, die während dieser Arbeit sequenziert wurden, sind unterstrichen.

Ac-Ala-Thr-Leu-Lys-Glu-Lys-Leu-Ile-Ala-Pro-Val-Ala-Gln-Gln-Glu-Thr-Thr-Ile-Pro-Asn-
 -----t1-----t142-----t7-----20
 Asx-Lys-Ile-Thr-Val-Val-Gly-Val-Gly-Gln-Val-Gly-Met-Ala-Cys-Ala-Ile-Ser-Ile-Leu-
 -----BVII t4-----t5-----40
 Gly-Lys-Ser-Leu-Thr-Asp-Glu-Leu-Ala-Leu-Val-Asp-Val-Leu-Glu-Asp-Lys-Leu-Lys-Gly-
 -----t6-----t7-----50 60
 Glu-Met-Met-Asp-Leu-Gln-His-Gly-Ser-Leu-Phe-Leu-Gln-Thr-Pro-Lys-Ile-Val-Ala-Asn-
 -----t8-----70 80
 Lys-Asp-Tyr-Ser-Val-Thr-Ala-Asn-Ser-Lys-Ile-Val-Val-Val-Thr-Ala-Gly-Val-Arg-Gln-
 -----BX-----t11-----90 100
 Gln-Glu-Gly-Glu-Ser-Arg-Leu-Asn-Leu-Val-Gln-Arg-Asn-Val-Asn-Val-Phe-Lys-Phe-Ile-
 -----110-----120
 Ile-Pro-Gln-Ile-Val-Lys-Tyr-Ser-Pro-Asn-Cys-Ile-Ile-Ile-Val-Val-Ser-Asn-Pro-Val-
 -----CTIV-----130 140
 Asp(Ile)Leu-Thr-Tyr-Val(Ala Trp Lys)Leu-Ser-Gly-Leu-Pro-Lys-His-Arg-Val-Ile-Gly-
 -----t18-19-----150 160
 Ser-Gly-Cys-Asn-Leu-Asp-Ser-Ala-Arg Phe-Arg Tyr-Leu-Met-Ala-Glu-Lys-Leu-Gly-Val-
 -----CTVI-----170 180
 His-Pro-Ser-Ser-Cys-His-Gly-Trp-Ile-Leu-Gly-Glu-His-Gly-Asp-Ser-Ser-Val-Ala-Val-
 -----CTVII-----190 200
 Trp-Ser-Gly-Val-Asn-Val-Ala-Gly-Val(Ser)Leu-Gln-Gln-Leu-Asx-Pro-Glx-Met-Gly-Thr-
 -----210-----220
 Asp-Asn-Asp-Ser-Glu-Asn-Trp-Lys-Glu-Val-His-Lys-Met-Val-Val-Glu-Ser-Ala-Tyr-Glu-
 -----BIII-----t27-----230 240
 Val-Ile-Lys-Leu-Lys-Gly-Tyr-Thr-Asn-Trp-Ala-Ile-Gly-Leu-Ser-Val-Ala-Asp-Leu-Ile-
 -----t28-----BVIII t3-----250 260
 Glu-Ser-Met-Leu-Lys-Asn-Leu-Ser-Arg-Ile-His-Pro-Val-Ser-Thr-Met-Val-Gln-Gly-Met-
 -----CTVIII-----270 280
 Tyr-Gly-Ile-Glu-Asn-Glu-Val-Phe-Leu-Ser-Leu-Pro-Cys-Val-Leu-Asn-Ala-Arg-Gly-Leu-
 -----290-----300
 Thr-Ser-Val-Ile-Asn-Gln-Lys-Leu-Lys-Asp-Glu-Val-Ala-Gln-Leu-Lys-Asn-Ser-Ala-
 -----310-----320
 Asp-Thr-Leu-Trp-Gly-Ile-Gln-Lys-Asp-Leu-Lys-Asp-Leu-COOH
 -----330-----

4. Die Primärstruktur der Schweine LDH-M₄

Die Sequenzanalysen einiger von W. Keil in seiner Dissertation isolierter Peptide sowie des BrCN-Peptids M₄ BIX erlaubten es, die endgültige Aminosäuresequenz der Schweine LDH-M₄ aufzustellen. Durch die Sequenzierung der tryptischen Subfragmente der Peptide M₄ CTII und M₄ CTI und des Peptids M₄ CTIV war es möglich, die noch vorhandenen Lücken zwischen den Positionen 14 - 42, 133 - 154 und 181 - 250 zu schließen.

Insbesondere konnte durch die beiden Peptide M₄ CTII t4 und M₄ CTII t5, die jeweils noch ein Methionin enthielten, die von W. Keil ermittelte Reihenfolge der BrCN-Fragmente bestätigt werden. Die Sequenzanalyse des Peptids M₄ CTI t2 erbrachte zudem, ebenso wie in der LDH-H₄, die Ermittlung von drei zusätzlichen Aminosäureresten in den Positionen 208 - 210.

Die Aminosäurereste 248 - 250 konnten aufgrund eines Gerätedefektes nicht identifiziert werden und wurden in Homologie zur LDH-H₄ eingesetzt. Die Numerierung der LDH-M₄ wurde analog zur LDH-H₄ durchgeführt; dadurch ergaben sich zwei Deletionen in den Positionen 17 und 332.

Die Peptide, die während dieser Arbeit sequenziert wurden, habe ich unterstrichen.

10 20
 Asn-Ala-Thr-Leu-Lys-Asn-Gln-Leu-Ile-His-Asn-Leu-Leu-Lys-Glu-Glu-His-----Val-Pro-His-
 -----CTII t3-----

30 40
 Asn-Lys-Ile-Thr-Val-Val-Gly-Val-Gly-Ala-Val-Gly-Met-Ala-Cys-Ala-Ile-Ser-Ile-Leu-
 -----CTII t4-----CTII t5-----

50 60
 Met-Lys-Gln-Leu-Ala-Asp-Glu-Ile-Ala-Leu-Val-Asp-Val-Met-Glu-Asn-Lys-Leu-Lys-Gly-

70 80
 Glu-Met-Met-Asp-Leu-Gln-His-Gly-Ser-Leu-Phe-Leu-Arg-Thr-Pro-Lys-Ile-Val-Ser-Gly-

90 100
 Lys-Asp-Tyr-Asn-Val-Thr-Ala-Asn-Ser-Arg-Leu-Val-Val-Ile-Thr-Ala-Gly-Ala-Arg-Gln-
 -----bIX-----

110 120
 Gln-Glu-Gly-Glu-Ser-Arg-Leu-Asn-Leu-Val-Gln-Arg-Asn-Val-Asn-Ile-Phe-Lys-Phe-Ile-

130 140
 Ile-Pro-Asn-Ile-Val-Lys-Tyr-Ser-Pro-Asn-Cys-Lys-Leu-Leu-Val-Val-Ser-Asn-Pro-Val-
 -----CTIV-----

150 160
 Asp-Ile-Leu-Thr-Tyr-Val-Ala-Trp-Lys-Ile-Ser-Gly-Phe-Pro-Lys-Asn-Arg-Val-Ile-Gly-
 -----CTIV t6-----

170 180
 Ser-Gly-Cys-Asn-Leu-Asp-Ser-Ala-Arg-Phe-Arg-Tyr-Leu-Met-Gly-Glu-Arg-Leu-Gly-Val-

190 200
 His-Pro-Leu-Ser-Cys-His-Gly-Trp-Ile-Leu-Gly-Glu-His-Gly-Asp-Ser-Ser-Val-Pro-Val-
 -----CTI t1-----CTI t2-----

210 220
 Trp-Ser Gly-Val-Asn-Val-Ala-Gly-Val-Ser-Leu-Lys-Asn-Leu-His-Pro-Glu-Leu-Gly-Thr-
 -----CTI t3-9-----

230 240
 Asp-Ala-Asp-Lys-Glu-His-Trp-Lys-Ala-Val-His-Lys-Glu-Val-Val-Asp-Ser-Ala-Tyr-Glx-
 -----CTI t5-9-----

250 260
 Val-Ile-Lys-Leu-Lys-Gly-Tyr(Thr Asx)Trp-Ala-Ile-Gly-Leu-Ser-Val-Ala-Asp-Leu-Ala-

270 280
 Glu-Ser Ile-Met-Lys-Asn-Leu-Arg-Arg-Val-His-Pro-Ile-Ser-Thr-Met-Ile-Lys-Gly-Leu-

290 300
 Tyr-Gly-Ile-Lys-Glu-Asn-Val-Phe-Leu-Ser-Val-His-Lys-Ile-Leu-Gly-Glu-Asn-Lys-Ile-

310 320
 Ser-Asp-Val-Val-Lys-Val-Thr-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Glu-Ala-His-Leu-Lys-Lys-Ser-Ala-

330
 Asp-Thr-Leu-Trp-Gly-Ile-Gln-Lys-Glu-Leu-Gln-----Ile-COOH

1. Sequenzvergleich

Ein Vergleich zwischen den drei bisher bekannten LDH-Sequenzen (Abb. 10) der Dornhai-LDH-M₄⁽⁵⁶⁾ und der Schweine-LDH-H₄ und -M₄ zeigt, daß alle drei Primärstrukturen in großen Bereichen identisch sind. Der Anteil beträgt bei diesen drei Enzymen 65%.

Besonders auffällig ist die Häufung der Aminosäureaustausche im aminoterminalen Arm (Pos. 9 - 20) und in der C-terminalen Region (Pos. 296 - 318). Beide Sequenzbereiche sind in der Tertiärstruktur benachbart und befinden sich an der Oberfläche des Moleküls, sind aber am Katalysemechanismus nicht beteiligt. Eine weitere Region gehäufter Austausche (50%) ist in dem Bereich um das essentielle Histidin-Peptid festzustellen (182 - 210). Die beiden Schweineenzyme zeigen auch in diesen Positionen eine sehr starke Homologie (nur zwei Austausche), während die Austauschrate gegenüber der Dornhai-LDH-M₄ beträchtlich erhöht ist (16 von 29 AS-Reste). Verwunderlich ist vor allem das Fehlen der drei Aminosäurereste 208 - 210 in der Dornhai-LDH-M₄. Die Röntgenstrukturanalyse gibt bisher keinen Hinweis auf die Existenz dieses zusätzlichen Tripeptides in der Dornhai-LDH-M₄⁽⁶³⁾, während die Zuordnung dieser Positionen in der Schweine-LDH-H₄ auch nach der Elektronendichte in diesem Bereich möglich ist⁽⁶³⁾. Zieht man in diese Betrachtung die schon bekannten Sequenzbereiche der Hühner-LDH-H₄ und -M₄ mit hinein, so bleibt festzustellen, daß die Unterschiede in der Aminosäuresequenz der gleichen Isoenzyme verschiedener Spezies weitaus geringer sind als die verschiedener Isoenzyme desselben Tieres. Auffällig ist hierbei, daß die hohen Austauschraten im amino- und carboxyl-terminalen Bereich zwischen den beiden H₄-Isoenzymen sehr viel geringer sind als bei den bekannten drei M₄-Isoenzymen.

10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35																																																																	

(D-H) und der Schweine LDI-H4 und -H5. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt. Die Sequenzen sind umrandet.

Die stärkere Homologie dieser beiden LDH-H₄ Isoenzyme könnte die Beobachtung aus immunologischen Versuchen erklären, daß bei verschiedenen Säugetierspezies gute Immunantworten gegen die LDH-M₄ häufiger sind als gegen die LDH-H₄. Voraussetzung dazu wäre allerdings, daß die LDH-H₄ dieser Tierspezies ebenfalls eine starke Homologie zur Schweine LDH-H₄ aufweist und damit nicht als Fremdprotein erkannt wird.

Das aktive Zentrum der LDH

Das aktive Zentrum der LDH stellt den Bereich im Enzym dar, in dem das Coenzym und das Substrat gebunden und sodann der chemischen Umsetzung unterworfen werden. Einige Arbeitsgruppen haben versucht, durch chemische Modifizierung die Aminosäurereste zu ermitteln, die an diesem Prozess beteiligt sind. Dabei konnten jeweils ein Cystein-⁽⁶⁴⁾, ein Histidin-⁽⁶⁵⁾ und ein Tyrosinrest^(58,59) spezifisch modifiziert werden und die Aminosäuresequenz in ihrer Umgebung ermittelt werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß bis zu drei Arginine für die Katalyse von Bedeutung sind^(66,67). Diese Informationen erlaubten es aber noch nicht, ein genaues Bild des Katalysenmechanismus zu entwerfen. Erst die Ermittlung der Primärstruktur der Dogfisch LDH-M₄ durch S.S. Taylor^(55,57) und die ebenfalls durchgeführte Röntgenstrukturanalyse von M. Rossmann et al.^(57,28) machten es möglich, einem Teil obiger Aminosäurereste eine Funktion bei der Katalyse zuzuordnen⁽²⁸⁾. Nach der Ermittlung der Primärstruktur der Schweine LDH-Isoenzyme war es nötig geworden, den Katalysenmechanismus der LDH neu zu überdenken, da die Primärstruktur der Dogfisch LDH-M₄ in großen Bereichen revidiert werden mußte^(55,56). Dabei wurde erkannt, daß Aminosäuren, deren Anwesenheit im Bereich des aktiven Zentrums nur schwer interpretierbar war, z.B. Glu (140), Lys (250), nun keine Funktion mehr bei der Katalyse haben, während andere Aminosäurereste, z.B. Tyr 239(237) ihren Platz erhalten haben^(58,59).

Unter Zuhilfenahme der Ergebnisse der Röntgenstrukturanalyse soll hier die Gestalt des aktiven Zentrums erläutert werden (Abb. 11).



Abb. 11 : Schematische Darstellung des aktiven Zentrums der IDH. (15) bis (20) sind die Aminosäuren, die an der Katalyse beteiligt sind.

Zu erkennen ist eine deutliche Aufteilung in zwei Bereiche. Der Adenosinteil des Coenzyms befindet sich in einer hydrophoben Tasche und wird durch zusätzliche Wasserstoffbrücken (Tyr 83 (85), Asp 52 (53) in seiner Lage stabilisiert. Den anderen Teil besetzen der Nicotinamidring des Coenzyms und das Substrat. In diesem Bereich liegen auch die für die eigentliche Katalyse wichtigen Aminosäuren His 193 (195) und Arg 169 (171). Über dieser Öffnung befindet sich die "loop", deren Schließen beim Übergang zum ternären Komplex eine Verdrängung des Lösungsmittels aus der Substratbindungstasche bewirkt.

Die Öffnung zwischen der beweglichen "loop" und dem starren Teil des Moleküls ist von einem Ring negativer Ladungen umgeben. Daran sind die folgenden Asparaginsäure- und Glutaminsäurereste beteiligt: Glu 104 (107), Asp 195 (197), Glu 236 (234) und Glu 240 (238). In der Schweine LDH-M₄ kommt noch Glu 233 (231) hinzu.

Die positive Guanidinium-Gruppe von Arg 106 (109) muß diesen Ring beim Übergang vom Apoenzym zum ternären Komplex passieren. Damit ist gleichzeitig das Schließen der "loop" verbunden. Wodurch diese Bewegung hervorgerufen wird, ist bislang noch nicht erklärbar. Jedoch könnte die Anwesenheit der positiven Ladung von Arg 106 (109) im aktiven Zentrum eine Ursache für die schwächere Bindung von NAD⁺ verglichen mit NADH sein.

Jeckel⁽⁶⁰⁾ konnte durch chemische Modifizierung mit diazotierter Sulfanilsäure des Tyrosinrestes 239(237) bei der LDH-H₄ die bei dem unbehandelten Enzym zu beobachtende Pyruvathemmung zum Verschwinden bringen. Ob die von Jeckel beschriebene Nitrierung, die die pH-Abhängigkeit der Dissoziationskonstanten des binären LDH-NADH-Komplexes beeinflusst, ebenfalls am Tyrosin 239 (237) stattfindet, kann letztlich nur

durch Isolierung des modifizierten Peptides geklärt werden. Wegen der in der Umgebung des Tyrosins 239 (237) vorhandenen Häufung negativer Ladungen ist es schwer verständlich, warum eine zusätzliche negative Ladung einen derartig starken Einfluß auf die Coenzymbindung haben sollte.

Die A-Seitenspezifität der LDH, deren Ursache zunächst einer möglichen Wasserstoffbrücke zwischen der Pos. 250 (Lys) und der Carboxamidgruppe des Nicotinamids zugesprochen wurde, läßt sich aufgrund der neuen Sequenzdaten nur noch auf eine leichte sterische Hinderung nahe der 5-Position des Nicotinamidringes durch den Threoninrest 248 (246) zurückführen. Zudem wäre ein Schließen der "loop" bei einem um 180° gedrehten Nicotinamidring nicht möglich. Ebenso hat der hydrophobe Charakter auf der B-Seite des Nicotinamidringes durch die nun festgestellte Anwesenheit der beiden Aminosäuren Val 136 (138) und Isoleucin 252 (250) zugenommen.

7. Unterschiede im aktiven Zentrum zwischen H_4 und M_4

Die bislang durchgeführten Röntgenstrukturanalysen der Dogfisch LDH- M_4 ⁽⁵⁷⁾ und der Schweine-LDH- H_4 ⁽⁶¹⁾ ließen erkennen, daß beide Moleküle sich in ihrer Tertiärstruktur äußerst wenig unterscheiden.

Aus Tabelle 7 wird ersichtlich, daß die Aminosäuren im aktiven Zentrum nur sehr wenige Austausche zeigen. Diese müssen aber ursächlich in Zusammenhang gebracht werden mit den unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften der LDH-Isoenzyme.

Die Aminosäuren in der hydrophoben Tasche, in der das Adenosin gebunden wird, sind in drei Positionen so ausgetauscht, daß diese Reste in der H_4 kürzer sind als in der M_4 . Diese Tatsache läßt sich mit einer schwächeren Bindung des Adenosinteils in der H_4 , verglichen zur M_4 , korrelieren.

Ein gravierender Austausch hat in der Position 30 ⁽³¹⁾ stattgefunden. Statt Alanin, wie in der LDH- M_4 , wurde für die LDH- H_4 Glutamin gefunden. Dieses Glutamin in der LDH- H_4 bildet eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zum Nicotinamidphosphat aus. Damit verbunden ist eine festere Bindung und eine Verschiebung des Nicotinamidteils des Coenzyms um mindestens 1 Å aus dem aktiven Zentrum. Diese Positionierung könnte eine Ursache dafür sein, daß die Ausbildung des kovalenten NAD-Pyruvat-Adduktes zwischen dem Kohlenstoffatom 3 des Pyruvats und der Position 4 des Nicotinamidringes in der LDH- H_4 leichter möglich ist. Die Bildung des ternären LDH-NAD-Pyruvat-Komplexes soll nach den Ergebnissen von Fromm ⁽⁶⁸⁾ und Gutfreund et al. ⁽⁶⁹⁾ die Ursache der Pyruvat-hemmung bei der LDH- H_4 sein. Dem widersprechen die Ergebnisse von Jeckel ⁽⁶⁰⁾, der zeigen konnte, daß die Bildung dieses ternären Komplexes bei der S-Cyano-LDH- H_4 und bei der Azo-LDH- H_4 genauso wie beim

	Nummer	Schwein H4	Schwein M4	Dogfish M4
Adenin	28(27)	Val	Val	Val
	1(52)	Val	Val	Val
	2(53)	Asp	Asp	Asp
	3(54)	Val	Val	Val
	4(85)	Tyr	Tyr	Tyr
	34(96) *	Val	Ile	Ile
	96(98)	Ala	Ala	Ala
	116(119) *	Val	Ile	Ile
Adenin- ribose	120(123)	Ile	Ile	Ile
	27(28)	Gly	Gly	Gly
	29(30)	Gly	Gly	Gly
	52(53)	Asp	Asp	Asp
	54(55) *	Leu	Met	Met
Pyrophosphat	57(58)	Lys	Lys	Lys
	30(31) *	Gln	Ala	Ala
	57(58)	Lys	Lys	Lys
	97(99)	Gly	Gly	Gly
	99(101)	Arg	Arg	Arg
Nucleotinsäure- ribose	242(245)	Tyr	Tyr	Tyr
	31(32)	Val	Val	Val
	95(97)	Thr	Thr	Thr
	98(100) *	Val	Ala	Ala
Nucleotinsäure- amid	137(139)	Ser	Ser	Ser
	31(32)	Val	Val	Val
	136(138)	Val	Val	Val
	138(140)	Asn	Asn	Asn
	165(167)	Leu	Leu	Leu
Substrat	248(246)	Thr	Thr	Thr
	252(250)	Ile	Ile	Ile
	108(109)	Arg	Arg	Arg
	169(171)	Arg	Arg	Arg
Negativer Ring	193(195)	His	His	His
	164(157)	Glu	Glu	Glu
	105(108)	Ser	Ser	Ser
	194(196)	Gly	Gly	Gly
	195(197)	Asp	Asp	Asp
	233(231) *	Met	Glu	Asp
	236(234) *	Glu	Asp	Asp
	239(237)	Tyr	Tyr	Tyr
	240(238)	Glu	Glx	Glu

* nur in diesen Positionen haben Austausche stattgefunden

Tabelle 7: Aminosäurereste im aktiven Zentrum der
Lactatdehydrogenase

unbehandelten Enzym stattfindet, daß aber die Hemmung durch überschüssiges Pyruvat nicht mehr vorhanden ist. Eine Erklärung der Pyruvathemmung der LDH-H₄ bedarf daher weiterer Untersuchungen.

Die Verschiebung des Nicotinamidringes in der LDH-H₄ führt gleichzeitig zu einer Wechselwirkung mit der Carbonylgruppe des Aminosäurerestes 137 (139) und der Carboxamidgruppe des Nicotinamids. Diese Wechselwirkung kann durch Modifikation der Carboxamidgruppe gestört werden und somit die größere Empfindlichkeit des H₄-Isoenzyms auf solche Veränderungen erklären.

Das Resultat dieser oben angeführten Aminosäureaustausche ist, daß das Coenzym in der LDH-H₄ aufgrund der weiträumigeren Adenintasche zunächst schwieriger die richtige Orientierung findet, daß es aber aufgrund der zwei zusätzlichen Wasserstoffbrücken letztlich sehr viel fester bindet als in der LDH-M₄. Diese Ergebnisse können eine Erklärung für die unterschiedlichen Dissoziationskonstanten für NAD⁺ bei der LDH-M₄ und -H₄ sein.

Da der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Lactatdehydrogenasereaktion die Dissoziation des Coenzyms vom Enzym ist ⁽⁶²⁾, bringt die zu Beginn schlechtere Einpassung und die schließlich festere Bindung des Coenzyms eine verringerte Umsatzgeschwindigkeit des H₄ - Isoenzyms mit sich.

Die veränderte Position des Coenzyms in der LDH-H₄ vergrößert zudem den Zwischenraum zwischen der "loop" und dem starren Teil des Moleküls, wodurch die sterische Hinderung für den aliphatischen Rest längerkettiger α -Ketocarbonsäuren verringert wird und sich die Substratspezifität der LDH-H₄ vermindert.

Bei der Betrachtung dieser Unterschiede wird klar, daß nicht drastische Änderungen in der Konformation, sondern der Austausch weniger wichtiger Amino-

säurereste für die individuellen Eigenschaften
der LDH-Isoenzyme verantwortlich sind.

VI. Zusammenfassung

1. Aus dem ersten Versuchsansatz ließen sich 60% der tryptischen Peptide der LDH-H₄ isolieren.
2. Nach Einführung der "doppelten" Citraconylierung gelang im zweiten Ansatz die Isolierung aller 9 Argininpeptide.
3. Durch manuellen und automatischen Edman-Abbau wurden 79% der Primärstruktur der LDH-H₄ aufgeklärt.
4. Bei der Sequenzanalyse der tryptischen Peptide wurden 7 der insgesamt 9 Methionine erfaßt. Dadurch konnte die Reihenfolge der BrCN-Fragmente in der LDH-H₄ eindeutig bestimmt werden.
5. Zusammen mit den Sequenzen der BrCN-Fragmente konnte die vollständige Primärstruktur der LDH-H₄ aufgeklärt werden.
6. Mit Hilfe der automatischen Sequenzierung wurden die noch nicht bekannten Bereiche der LDH-M₄ erfaßt und auch bei diesem Isoenzym die vollständige Aminosäuresequenz ermittelt.
7. Die H-Kette enthält 333, die M-Kette 331 Aminosäurereste, von denen 254 identisch sind.
8. Die bekannten Peptide mit essentiellen Aminosäureresten (Cys 163, His 193 und Tyr 239) konnten in die Sequenz eingeordnet werden.
9. Besonders hohe Austauschraten wurden im aminoterminalen Arm und im C-terminalen Bereich gefunden.

10. Die Aminosäurereste im aktiven Zentrum sind in nur wenigen Positionen, meist konservativ, ausgetauscht.
11. Ein gravierender Austausch in der Position 30 (in der LDH-M₄ Ala, in der LDH-H₄ Gln) scheint die Hauptursache der unterschiedlichen katalytischen Eigenschaften der beiden Isoenzyme zu sein.
12. Aufgrund der in dieser Arbeit ermittelten Sequenzdaten ist der Katalysemechanismus der LDH-Reaktion besser verständlich geworden.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Neillands, J.B., Science, 115, 143 (1952)
- 2) Vesell, F.S. und A.G. Bearn, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 94, 96 (1957)
- 3) Wieland, T. und G. Pfeleiderer, Biochem. Z., 329, 112 (1957)
- 4) Markert, C.L. und F. Möller, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 55, 157 (1957)
- 5) Apella, E. und C.L. Markert, Biochem. Biophys. Res. Com., 6, 171 (1961)
- 6) Rajewsky, K., S. Avrameas, P. Grabar, G. Pfeleiderer und E.D. Wachsmuth, Biochim. Biophys. Acta, 92, 248 (1964)
- 7) Cahn, R.D., N.O. Kaplan, L. Levine und E. Zwilling, Science, 136, 962 (1962)
- 8) Pfeleiderer, G. und E.D. Wachsmuth, Biochem. Z., 334, 185 (1961)
Wieland, T., G. Pfeleiderer, I. Haupt und W. Wörner, Biochem. Z., 332, 1 (1959)
- 10) Pfeleiderer, G. und E.D. Wachsmuth, Klin. Wochenschr., 39, 352 (1961)
- 11) Wachsmuth, E.D., G. Pfeleiderer und T. Wieland, Biochem. Z., 340, 80 (1964)
- 12) Nisselbaum, J.S., D.E. Packer und O. Bodansky, J. Biol. Chem., 239, 2830 (1964)
- 13) Battellino, L.J. und A. Blanco, J. Exptl. Zool., 174, 173 (1970)
- 14) Lane, R.S. und E.E. Dekkar, Biochemistry, 8, 2958 (1969)
- 15) Nisselbaum, J.S. und O. Bodansky, J. Biol. Chem., 238, 969 (1963)
- 16) Pesce, A., R.H. McKay, F.E. Stolzenbach, R.D. Cahn und N.O. Kaplan, J. Biol. Chem., 239, 1753 (1964)
- 17) Pesce, A., T.P. Fondy, F.E. Stolzenbach, F. Castillo und N.O. Kaplan, J. Biol. Chem., 242, 2151 (1967)
- 18) Fondy, T.P., A. Pesce, I. Freedberg, F.E. Stolzenbach und N.O. Kaplan, Biochemistry, 3, 522 (1964)

- 19) Wilson, A.C., N.O.Kaplan, L.Levine, A.Pesce, M.Reichlin
und W.S.Allison, Fed. Proc., 23, 1258 (1964)
- 20) Markert, C.L. und E.Apella, Ann. N. Y. Acad. Sci.,
103, 915 (1963)
- 21) Kaplan, N.O. und M.H.Ciotti, Ann.N. Y. Acad. Sci.,
24, 701 (1961)
- 22) Anderson, B.M. und N.O.Kaplan, J. Biol. Chem., 234,
1226 (1959)
- 23) Kaplan, N.O., J.Everse und J.Admiraal, Ann. N.Y. Acad.
Sci., 151, 400 (1968)
- 24) Plagemann, P.G.W., K.F.Gregory und F.Wroblewski,
Biochem. Z., 334, 37 (1961)
- 25) Stinson, R.A. und J.J.Holbrook, Biochem. J., 131, 719
(1968)
- 26) Velick, S.F., J. Biol. Chem., 233, 1455 (1958)
- 27) Hinz, H.J. und R.Jaenicke, Biochemistry, 14, 24 (1975)
- 28) Holbrook, J.J., A.Liljas, S.J.Steindel und M.G.Rossmann
in The Enzymes, ed. F.D.Boyer (Academic Press, New
York 1975) 3rd edn., Vol. XI , pp 191- 292
- 29) Kiltz, H.H., Private Mitteilung
- 30) Keil, W., Dissertation, Bochum (1976)
- 31) Raftery, M.A. und R.D.Cole, Bioch. Biophys. Res. Com.,
10, 467 (1963)
- 32) Atasci, M.Z. und A.F.S.A.Habeb in Methods in Enzymolo-
gy, Vol. XXV, 546ff (Acad. Press N.Y. 1972)
- 33) Jany, K.D., W.Keil, H.Meyer und H.H.Kiltz, BBA im Druck
- 34) Ponstingl, H., H.J.Braun, M.Hess und N.Hilschmann
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 352, 195 (1972)
- 35) Roseblatt, M.S., M.N.Margolies, L.E.Cannon und
E.Haber, Anal. Biochem., 65, 321 (1975)
- 36) Moore, S. und W.Stein, J. Biol. Chem., 211, 907 (1954)
- 37) Clotten, R. und A.Clotten, "Hochspannungselektrophorese",
137, G.Thieme Verlag (1962)
- 38) Pauly, H., Z. Physiol. Chem., 94, 288 (1915)
- 39) Rydon, H. und P.Smith, Nature, 169, 922 (1952)
- 40) Tamura, H. und N.Ui, J. Biochem. (Tokyo), 71, 543 (1972)

41. Laurer, H.R., "Disk Elektrophorese", de Gruyter Verlag, Berlin (1968)
42. Houston, L.L., Anal. Biochem., 44, 81 (1971)
43. Ambler, R.P., in Methods in Enzymology Vol. XI, 155 (Acad. Press N.Y. 1967)
44. Edman, P., Acta Chem. Scand., 10, 761 (1956)
45. Mendez, E. und C.Y.Lai, Anal. Biochem., 68, 47 (1975)
46. Laursen, R.A., Europ. J. Biochem., 20, 89 (1971)
47. Edman, P. und G.Bregg, J. Europ. Biochem., 1, 80 (1967)
48. Pisano, J.J., in Methods in Enzymology Vol. XXV, 27 (Acad. Press N.Y. 1972)
49. Braunitzer, G., B.Schrank, S.Petersen und U.Petersen, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 354, 1563 (1973)
50. Wittmann-Liebold, B., Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 1415 (1973)
51. Hella, K., H.J. Torff, E.T.J.Fölsche und G.Pfleiderer Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 350, 28 (1969)
52. Hella, K., Private Mitteilung
53. Böhn, P., Diplomarbeit, Frankfurt/Main (1967)
54. Klapper, M.H. und J.M.Klotz in Methods in Enzymology Vol. XXV, 531 (Acad. Press N.Y. 1972)
55. Eventoff, W., I.G.Rossmann, S.S.Taylor, H.J.Torff, H.Meyer, W.Keil und H.H.Kiltz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA in Vorbereitung (1976)
56. Taylor, S.S., J. Biol. Chem., zur Veröffentlichung eingereicht (1976)
57. Adams, M.J., M.Buehner, K.Chandrasekhar, G.C.Ford, H.L.Hackert, A.Liljas, M.G.Rossmann, I.E.Smiley, W.S.Allison, J.Everse, N.O.Kaplan und S.S.Taylor, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 1968 (1973)
58. Di Sabato, G., Biochemistry, 4, 2288 (1965)
59. Jeckel, D., R.Anders und G.Pfleiderer, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 352, 769 (1971)
60. Jeckel, D., Habilitationsschrift, Bochum (1976)
61. Eventoff, W., M.L.Hackert und M.G.Rossmann, J. Mol. Biol., 98, 249 (1975)
62. Schwert, G.W., J. Biol. Chem., 244, 1285 (1969)

- 63) Rossmann, M.G. und W. Eventoff, Private Mitteilung
- 64) Pfeleiderer, G. und D. Jeckel, Eur. J. Biochem. 2, 171 (1967)
- 65) Woenkhaus, C., J. Berghäuser und G. Pfeleiderer, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 350, 473 (1969)
- 66) Yang, P.C. und G.W. Schwert, Biochemistry, 11, 2218 (1972)
- 67) Berghäuser, J. und I. Falderbaum, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 352, 1189 (1971)
- 68) Fromm, H.J., J. Biol. Chem., 238, 2938 (1963)
- 69) Gutfreund, H., R. Cantwell, C.H. McMurray, R.S. Criddle und G. Hathaway, Biochem. J., 106, 683 (1968)

Lebenslauf

- 28.12.1948 Geburt als erstes Kind des Elektromeisters Erich Meyer und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Brandstädter, in Salzwedel.
- 1950 Übersiedlung meiner Familie nach Recklinghausen.
- April 1955 Einschulung in die Volksschule "Im Reitwinkel".
- April 1959 Aufnahme auf das Gymnasium Petrinum in Recklinghausen.
- Juni 1967 Abitur.
- Oktober 1967 Beginn der 18-monatigen Wehrpflichtzeit in Wildeshausen.
- April 1969 Halbjähriges Praktikum bei den Chemischen Werken in Hüls.
- Oktober 1969 Studienbeginn in Biochemie an der Universität Tübingen.
- 12.8.1971 Eheschließung mit Marita Jerosch.
- März 1974 Diplomprüfung in Biochemie.
- November 1974 Abschluß meiner Diplomarbeit am Organisch-chemischen Institut der Universität Tübingen.
- November 1974 Beginn der Doktorarbeit am Biochemischen Institut der Ruhr-Universität Bochum.

